

Aus der Klinik für Ophthalmologie
- Direktor: Prof. Dr. Johann Roider -
am Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel
an der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel

**OCT- MORPHOLOGISCHE KLASSIFIKATION
VON PHOTOKOAGULATIONS LÄSIONEN
AN DER KANINCHENNETZHAUT**

&

**VALIDIERUNG EINES
TEMPERATURABHÄNGIG GESTEUERTEN
PHOTOKOAGULATIONS LASERS MIT ECHTZEIT- FEEDBACK
ZUR ERZEUGUNG UNTERSCHIEDLICHER LÄSIONSINTENSITÄTEN**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der
Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel

vorgelegt von
CAROLA HESSE
aus Hamburg

Kiel 2019

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Johann Roider
Klinik für Ophthalmologie

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Petra Ambrosch
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde,
Kopf- und Halschirurgie

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 28. Juni 2019

Tag der mündlichen Prüfung:

Kiel, den 11. September 2019

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	S. 1
1.1 GESCHICHTE UND AKTUELLE FORTSCHRITTE DER RETINALEN PHOTOKOAGULATION	S. 1
1.2 RETINALE PHOTOKOAGULATION	S. 2
1.2.1 Indikationen	S. 2
1.2.2 Klinische Durchführung	S. 2
1.2.3 Wirkungen und Nebenwirkungen	S. 2
1.3 DAS PROBLEM DER DOSISFINDUNG	S. 4
1.4 DIE ABHÄNGIGKEIT DES LASERSCHADENAUSMAßES VON DER NETZHAUTTEMPERATUR	S. 5
1.4.1 Zusammenhang zwischen Temperatur, Zeit und Netzhautschaden: Das Arrhenius- Schadensintegral	S. 5
1.4.2 Grundlage der automatischen Dosiskontrolle: Die adaptierte Arrheniuskurve	S. 6
1.5 FRAGESTELLUNGEN DIESER ARBEIT	S. 7
2. MATERIAL UND METHODEN	S. 9
2.1 DER BEHANDLUNGSLASER	S.9
2.1.1 Optoakustische Netzhauttemperaturmessung	S. 10
2.1.2 Automatische Effektsteuerung durch Echtzeit- Temperaturrückkopplung	S. 11
2.2 DER VERSUCHSAUFBAU	S. 12
2.2.1 Der Tierversuch	S. 12
2.2.2 Die Photokoagulation - Kontrollläsionen versus TTC- Läsionen TTC- Lesion = Time- Temperature- Characteristic- Lesion = Temperaturkontrollierte, automatisch gesteuerte Läsionen	S. 13
2.3 BILDICHE DOKUMENTATION UND VERMESSUNG DER LÄSIONEN	S. 14
2.3.1 Fundusfarbfotographie	S. 14
2.3.2 Optische Kohärenztomographie	S. 15
2.4 STATISTIK	S. 19
3. ERGEBNISSE	S. 20
3.1 KLASSIFIKATION DER HERDINTENSITÄTEN ANHAND DER OCT- MORPHOLOGIE: DIE OCT- SCHADENSKLASSEN	S. 20

3.2	VALIDITÄT DER GEFUNDENEN OCT- SCHADENSKLASSEN	S. 22
3.2.1	Läsionsdurchmesser im Fundusfarbfoto und in der OCT	S. 22
3.2.2	Realleistungen und Spitzenendtemperaturen	S. 24
3.2.3	Heilungsverlauf über drei Monate	S. 25
3.2.4	Einfluss des individuellen Auges	S. 26
3.2.5	Gegenüberstellung der Validitätskriterien	S. 26
3.3	TIME- TEMPERATURE- CHARACTERISTIC- LESIONS	S. 27
3.3.1	Funduskopische Sichtbarkeit und Nachweise in der OCT	S. 27
3.3.2	Läsionsdurchmesser im Fundusfarbfoto und in der OCT	S. 28
3.3.3	Gegenüberstellung der Validitätskriterien	S. 29
3.4	BEWERTUNG DER TTC- LÄSIONSGRUPPEN ANHAND DER ERMITTELTEN OCT- SCHADENSKLASSEN	S. 30
4.	DISKUSSION	S. 32
4.1	BESCHREIBEN VON PHOTOKOAGULATIONS LÄSIONEN	S. 32
4.2	ECHTZEIT- DOSIMETRIE VON PHOTOKOAGULATIONS LASERN	S. 33
4.2.1	Ansätze zur Lösung des Dosisproblems	S. 33
4.2.2	Automatische Dosiskontrolle mittels temperaturabhängig gesteuertem Photokoagulationslaser	S. 36
4.2.3	Limitationen des optoakustischen Temperaturmessverfahrens und technische Grenzen der temperaturgestützten Echtzeit- Dosimetrie	S. 37
4.2.4	Anwendungsmöglichkeiten optoakustischer Echtzeit- Dosimetrie	S. 39
4.3	KLINISCHE BEDEUTUNG DER LÄSIONSKLASSEN	S. 40
4.3.1	Thermisch stimulierende Läsionen	S. 40
4.3.2	Subvisible Lesions	S. 41
4.3.3	Modulationen der klassischen Photokoagulationsläsionen	S. 42
4.4	REFLEKTION DER VERFAHREN	S. 43
4.4.1	Läsionsdokumentation in Fundusfarbfotographie, OCT, Histologie und Fluoreszenzangiographie	S. 43
4.4.2	Tierexperimentelle Studien - das Kaninchen als Photokoagulationsmodell	S. 44
4.4.3	Alternative Verfahren zur Photokoagulation	S. 46
5.	ZUSAMMENFASSUNG	S. 48

6. LITERATURVERZEICHNIS	S. 50
7. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	S. 55
8. AKADEMISCHER LEBENSLAUF	S. 57
9. DANKSAGUNG	S. 58
10. ANHANG	S. 59
10.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	S. 59
10.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	S. 60
10.3 GENEHMIGUNG ZUR VERSUCHSDURCHFÜHRUNG AN WIRBELTIEREN	S. 60
10.4 PUBLIKATIONEN I- IV, POSTER, VERÖFFENTLICHUNGEN	AB S. 64

1. EINLEITUNG

1.1 GESCHICHTE UND AKTUELLE FORTSCHRITTE DER RETINALEN PHOTOKOAGULATION

Die retinale Photokoagulation ermöglicht eine Behandlung der Netzhaut im Auginneren von außen ohne Eröffnung des menschlichen Körpers. Ein Laserstrahl wird in das Zielgebiet gerichtet und aufgrund der lokalen Hitzeentwicklung werden die gewünschten Netzhautgebiete gezielt zerstört und eine Narbenbildung induziert.

Historisch lässt sich das Behandlungsprinzip auf Platons Beobachtungen etwa 400 v.Chr. zurückführen. Er warnte vor Verbrennungen des Augenhintergrundes bei intensiver Betrachtung einer Sonnenfinsternis. Erste Versuche zur therapeutischen Anwendung machten Czerny und Deutschmann bereits 1867 und 1882. Sie leiteten gebündeltes Sonnenlicht durch die dilatierte Pupillen von Hasenaugen und erzeugten lichtinduzierte Narben an der Retina (Ip & Puliafito, 2009). Durch Gerhard Meyer-Schwickerath erhielt es Einzug in die Humanmedizin. Er entwickelte 1947-49 den Sonnenlichtkoagulator (Meyer-Schwickerath, 1967). Auf dem Dach der Hamburger Augenklinik wurde Sonnenlicht gebündelt, über Spiegel in den Operationssaal geleitet und Netzhauterkrankungen behandelt. Um unabhängig vom Wetter zu sein, entwickelte er in Zusammenarbeit mit den Carl Zeiss Werken die Xenon Hochdrucklampe. Im Laufe der Zeit entstanden mehrere Festkörper- und Gaslaser. Der Entwickler des ersten Feststofflasers, Rubinlaser (rot: 694 nm), war 1960 Theodore Maiman. Es folgte die Argonlasertechnologie (blau: 488 nm, grün: 514 nm), damit bestand eine breite klinische Anwendbarkeit. Ein großer Fortschritt war die Koppelung des Lasers an die Spaltlampe (Little et al., 1970), der Beginn kontrollierter Photokoagulation.

Die panretinale Photokoagulation erhielt ab 1976 vermehrt Aufmerksamkeit, als in der Diabetic Retinopathy Study der Nachweis erbracht wurde, dass mit Anwendung dieses Verfahrens das Fortschreiten der Erkrankung signifikant verhindert wird und das Risiko eines schweren Sehverlustes infolge einer proliferativen diabetischen Retinopathie in einem 2- Jahres- Zeitraum um 50% oder mehr gesenkt wird (The Diabetic Retinopathy Study Research Group, 1976; The second report of diabetic retinopathy study findings, 1978). Die panretinale Photokoagulation gilt nach wie vor als First- Line- Therapie bei der proliferativen Retinopathie. Die ‚Early Treatment Diabetic Retinopathy Study‘ = ETDRS (ETDRS report number 9, 1991) belegte die Wirksamkeit der frühen Lasertherapie bei diabetischer Makulopathie mit Makulaödem. Den Nachweis für die Wirksamkeit bei Venenast-verschlüssen erbrachte die ‚Branch Vein Occlusion Study Group‘ = BVOS (BVOS, 1984), und für Zentralvenenverschlüsse folgten die Ergebnisse der ‚Central Vein Occlusion Study Group‘ = CVOS (CVOS, 1995). Für ischämisch bedingte Netzhauterkrankungen ist die Lasertherapie unverzichtbar (Shah et al., 2011).

Seit über vierzig Jahren ist die Photokoagulation der Netzhaut unter Zuhilfenahme von Laserlicht ein fester Bestandteil der augenärztlichen Heilkunst und gilt seit ca. 30 Jahren als Goldstandard bei der Behandlung diverser Netzhauterkrankungen und ist heute aus der klinischen Routine nicht mehr wegzudenken.

1.2 RETINALE PHOTOKOAGULATION

1.2.1 Indikationen

Die retinale Photokoagulation hat ein breites Behandlungsspektrum. Indikationen sind ischämische Netzhauterkrankungen, z. B. diabetische Retinopathie, sowohl bei der proliferativen als auch bei der nichtproliferativen Form, und als Second-Line Therapie beim klinisch signifikanten Makulaödem. Des Weiteren wird es angewendet bei ischämischen Gefäßverschlüssen, also bestimmten Venenast- (BVOS, 1986) oder Zentralvenenthrombosen (CVOS, 1997) und zur Verödung von extrafovealen Gefäßneubildungen, wie bei der altersbedingten Makuladegeneration (AMD). Auch bei selteneren Erkrankungen wie der Frühgeborenen Retinopathie (ROP) und M. Coats (Framme et al., 2008) findet es Anwendung. Darüber hinaus hat es Nutzen bei der Behandlung von Netzhautforamina und -ablösungen, auch retinale Hämangiome und Aneurysmata lassen sich koagulieren.

1.2.2 Klinische Durchführung

Die retinale Photokoagulation kann ambulant durchgeführt werden. Der Patient sitzt dem Arzt gegenüber, sein Kopf findet Halt an einer Kinn- und Stirnstütze. Die Augen werden medikamentös in Mydriasis überführt und deren Oberfläche durch eine Tropfanästhesie betäubt, so dass ein Kontaktglas irritationslos aufgesetzt werden kann. Der behandelnde Arzt stellt im Voraus die vermutlich benötigte Laserleistung (je nach Gerät meist von 50 mW bis zu 1 W hin variabel vorwählbar), den Bestrahlungsdurchmesser (gewöhnlich 50-500 µm) und die Bestrahlungsdauer (üblicherweise 20- 500 ms) ein. Nach Applikation eines jeden Herdes wird die Laserleistung für die Folgeherde entsprechend nachjustiert. Hierfür wird die laserinduzierte ‚Weißfärbung‘ des Gewebes beurteilt: Sie stellt das akute Steuerungskriterium dar.

Je nach Indikation werden verschiedene Koagulationsmuster angewendet mit variierender Anzahl und Durchmesser der einzubringenden Herde. So gibt es weniger dichte „Mild Scatter“- (< 1200 Herde) und dichte „Full Scatter“- Photokoagulationen (> 1200 Herde), panretinale oder sektorielle Behandlungen und fokale, teilweise angiographisch gesteuerte Raster- /Grid- Formen bei der zentralen Behandlung. Bei speziellen Lasern kann automatisch mit jedem Auslösen ein Muster von bis zu 25 Läsionen in kurzen Intervallen (20- 30 ms je Läsion, insgesamt ca. 500 ms) nacheinander appliziert werden. Bei der panretinalen Behandlung werden mehrere hundert Herde, deren Durchmesser meist 200-500 µm beträgt, appliziert, die sich unter Aussparung der Makula über die gesamte Retina erstrecken. Im Bereich der Makula ist dabei äußerste Vorsicht geboten. Besonders hier gilt es den strukturellen und funktionellen Schaden so gering wie möglich zu halten und die Fovea centralis als ‚Punkt des schärfsten Sehens‘ zu schützen.

1.2.3 Wirkungen und Nebenwirkungen

Es können mehrere Licht- Gewebe- Wechselwirkungen unterschieden werden: Es gibt unter anderem thermomechanische, thermische und photochemische Lasereffekte. Die hier verwendete Methode nutzt aufgrund ihrer Bestrahlungsdauer im Millisekundenbereich den thermischen Effekt, also „Photokoagulation“, wobei die

wirksame physikalisch- biologische Interaktion auf einer laserinduzierten Temperaturerhöhung innerhalb des Gewebes beruht. Grundlage für den Temperaturanstieg ist die Absorption des Lichtes an pigmentierten Strukturen wie dem retinalen Pigmentepithel (RPE) und den Aderhautmelanozyten. Das RPE stellt den Hauptabsorber der eingestrahlten Energie dar und wirkt wie eine ‚Herdplatte‘, über der die retinalen Zellschichten thermisch denaturieren. Im zeitlichen Verlauf folgt eine biologische Wundheilungsreaktion und es kann, je nach Läsionsintensität, eine Koagulationsnarbe entstehen (Roider, 2001; Framme et al., 2008).

Untersuchungen zeigten, welche Auswirkungen Wellenlänge, Expositionszeit, Bestahlungsdurchmesser und die Laserleistung auf den Effekt haben. Detaillierte Messungen von Absorptionsspektren einzelner Pigmente am Augenhintergrund ergaben für jede Wellenlänge ein typisches Raum- Temperatur- Profil. Mit Ausnahme des IR (Infrarot)- Diodenlasers, mit einer Wellenlänge >700 nm, dessen räumliches Absorptionsprofil relevante Schäden auf Aderhautniveau erwarten lässt, dürfte die Abhängigkeit von der Wellenlänge im sichtbaren Bereich ohne konkrete klinische Relevanz sein. Zur Anwendung kommen überwiegend Laser mit 514 nm oder 532 nm Wellenlänge.

Die Expositionszeit beeinflusst die Wärmeableitung und damit die räumliche Ausdehnung der Läsion, bezeichnet wird dieses Phänomen auch als „thermal confinement“ für kurze bzw. „thermal blooming“ für lange Expositionszeiten (Palanker, 2016). Kürzere Bestrahlungszeiten von bis zu 50 ms bleiben eher auf das RPE und angrenzende Photorezeptorsegmente beschränkt, während mit zunehmender Bestrahlungszeit der Schaden in die inneren Netzhautschichten aufsteigt. Ein größerer Bestahlungsdurchmesser führt nicht nur zu größeren Läsionsdurchmessern, sondern verstärkt auch das Schadensausmaß der inneren Netzhautschichten, aufgrund des vermehrten axialen Wärmeflusses (Framme et al., 2008).

Weiterhin ist der Koagulationseffekt abhängig von der Laserleistung, diese bestimmt die Intensität einer Läsion. Die individuelle Leistungsanpassung einer jeden Exposition ist erforderlich, denn es bestehen stets interindividuelle als auch intraindividuelle anatomische Unterschiede. Die unterschiedliche Pigmentierung des Augenhintergrundes kann zu Absorptionsschwankungen führen und die brechenden Medien Hornhaut, Linse und Glaskörper können die Transmission beeinflussen.

Nach einer Theorie von Wolbarsht wird die positive Wirkung der Photokoagulationsbehandlung auf die retinale Ischämie über die Zerstörung der Photorezeptorzellen erklärt. Mit deren Destruktion kommt es zum Anstieg des Sauerstoff-partialdruckes in der Retina (Stefánsson, 2006). Stäbchen und Zapfen sind metabolisch hoch aktiv und haben den größten Sauerstoffbedarf innerhalb des retinalen Gewebes. Durch die gezielte Zerstörung eines Teils dieser Rezeptorzellen verbessert sich relativ die Sauerstoffversorgung der übrigen, verbleibenden Zellen. Eine andere Theorie zum Wirkmechanismus diskutiert die Zytokinexpression photokoagulierter Netzhaut. Das veränderte Zusammenspiel von VEGF, TGF- β (Transforming Growth Factor beta), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) führt demnach zur Reduktion der Angiogenese (Ogata et al., 2001; Jousen, 2012).

Die retinale Photokoagulation ist ein gewebedestruierendes Behandlungsverfahren und geht mit Nebenwirkungen einher. Währenddessen und im Anschluss können Schmerzen ausgelöst werden. Bei Überdosierungen kommt es schlimmstenfalls zu Netzhautrupturen und Aderhautblutungen (Velez- Montoya et al., 2010). Folge der Zerstörung von Photorezeptoren ist die Entstehung kleiner Gesichtsfelddefekte (Skotome), sowie Einschränkungen beim Dämmerungs- und Kontrastsehen. Kommt es bei ausgedehnter Koagulation zu einer Zerstörung der inneren Netzhaut und damit der Nervenfaserschicht, so soll der daraus resultierende Visusdefekt dem neuronal versorgten Areal entsprechen, welches deutlich über die konkret koagulierte Stelle hinausgeht (Brinkmann & Birngruber, 2007). Die Netzhautempfindlichkeit wird insgesamt vermindert (Fong et al., 2007).

Aufgrund dieser Nebenwirkungen ist es erstrebenswert, die Intensität des Lasers auf das notwendige Minimum zu reduzieren. Es gilt jedoch, die Effektivität seiner biologischen Wirksamkeit zu gewährleisten. Es gibt eine Vielzahl kleiner Studien, die belegen, dass bereits klinische schwache und/ oder funduskopisch nicht sichtbare Läsionen eine therapeutische Wirksamkeit haben (Bandello et al., 2001; Lavinsky et al., 2013; Roider et al., 2010; Brinkmann & Birngruber, 2007). Auch auf technischer Seite wird versucht, den laserinduzierten Netzhautschaden zu minimieren, z.B. durch gepulste Laser im Nano- oder Mikrosekundenbereich. Tatsächlich lässt sich bei Anwendung eines gepulsten Lasers mit entsprechender Energievoreinstellung eine Schadensreduktion herbeiführen bis hin zur selektiven Destruktion des RPE unter Schonung der Photorezeptoren (Roider et al., 1999; Brinkmann & Birngruber, 2007).

1.3 DAS PROBLEM DER DOSISFINDUNG

Die verschiedenen Indikationen verlangen unterschiedliche Koagulationsstärken. Es gibt Empfehlungen bezüglich Koagulationsmuster, Durchmesser, Applikationszeit sowie für den Läsionsabstand zueinander und der Anzahl der zu applizierenden Herde. Die meisten dieser Parameter werden vorab am Gerät eingestellt bzw. der Arzt bestimmt die Läsionsanzahl. Die Läsionsintensität jedoch wird manuell über die Einstellung der Laserleistung justiert. Dazu wird der Lasereffekt anhand der auftretenden Weißfärbung der Retina am vorherigen Herd beurteilt und die Laserleistung intensiviert oder reduziert. Die geforderte Läsionsintensität wird in diesem Fall nach untersucherabhängigen, recht subjektiven Kriterien beschrieben und z.B. unterteilt in „eben sichtbar“, „leicht“, „mäßig“ und „kräftig sichtbar“ (Palanker et al., 2011; Kandulla et al., 2006).

Die Beurteilung der Weißfärbung ist abhängig von dem Zeitpunkt der Beobachtung. Fünf bis zehn Minuten nach der Applikation bildet sich unter bestimmten Bedingungen eine grauweiße Randzone aus, was auf Sekundäreffekte hinweist, die wiederum abhängig sind von der Expositionsintensität und -dauer (Weinberg et al., 1981). Diese Arbeitsgruppe sprach sogar von einer „immer zu beobachtenden Zeitverzögerung der Weißfärbung“ (Birngruber et al., 1977 a). Die klinische Beurteilung des Intensitätsgrades unterliegt also zum einen einer zeitlichen Komponente, zum anderen der subjektiven Einschätzung des Arztes und führt damit zu deutlichen Schwankungen in der Beurteilung des Schadens.

Diese Überlegungen waren Gegenstand einer klinischen Studie zu der Dosiergenauigkeit in klinischen Photokoagulationsbehandlungen mit konventioneller Intensitätseinstellung. Eine systematische Überprüfung ergab stark schwankende Behandlungsergebnisse: nicht nur innerhalb einer Behandlung, sondern auch zwischen zwei Probanden eines Behandlers und zwischen unterschiedlichen Behandlern. Es kam zu einer Streubreite bis um den Faktor 2,6 der behandelten Netzhautfläche (Saeger et al., 2016). Damit ist die Vorhersagesicherheit bezüglich des entstehenden Effektes eingeschränkt, der therapeutische Gesamteffekt wird unkalkulierbar.

Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass mit Eintreten einer wenn auch schwachen Netzhautverfärbung bereits ein Schaden vorliegen kann, der histologisch nachweisbar alle Netzhautschichten erfasst (Koinzer et al., 2012). Demzufolge gestaltet sich eine schonende Leistungsanpassung schwierig, insbesondere wenn sanfte, netzhautschonende Läsionen appliziert werden sollen, ist die Präzision dieser manuellen Dosierung nach subjektiver Beurteilung anzuzweifeln. Denn die sanften Läsionen sind funduskopisch größtenteils nicht sichtbar, es fehlt die sichere Kontrolle bezüglich des erzielten Effektes.

1.4 DIE ABHÄNGIGKEIT DES LASERSCHADENAUSMAßES VON DER NETZHAUTTEMPERATUR

Die Läsionsintensität korreliert mit der laserinduzierten Temperaturentwicklung an der Netzhaut. Die erhitzende Wirkung des Lasers ist jedoch bei gleichen Behandlungsparametern variabel, da sie abhängig ist von den individuellen anatomischen und lokalen Gegebenheiten, wie z.B. Lichtdurchlässigkeit der brechenden Medien oder variierenden Pigmentierungsgrad des RPE. Es ist deshalb ein Verfahren wünschenswert, welches ein ortsadaptiertes prospektives Effektmonitoring ermöglicht.

Ein Verfahren, welches in der Lage ist, die Temperaturentwicklung an der Netzhaut während der Behandlung zu messen und die Bestrahlungsdauer in Echtzeit für jeden Herd anzupassen, wird hier vorgestellt und kommt in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung. Die theoretische Grundlage der Effektvorhersage bildet die Arrheniustheorie. Diese Theorie wurde als Ausgangshypothese verwendet und in umfangreichen Vorarbeiten empirisch adaptiert, um die hier vorgestellte Methode zu entwickeln.

1.4.1 Zusammenhang zwischen Temperatur, Zeit und Netzhautschaden: Das Arrhenius- Schadensintegral

Die Arrheniuskurve ist benannt nach Svante August Arrhenius, einem schwedischen Physiker und Chemiker (*1859 - †1927). Die Arrheniustheorie beschreibt den Übergang eines modellhaft als homogen angenommenen Stoffgemisches, in diesem Fall des Netzhautgewebes, von einem chemischen Zustand (unkoaguliert) in einen veränderten Zustand (koaguliert) als Ratenprozess erster Ordnung. Wir nehmen an, dass die Koagulation der Netzhaut bei Eintreten einer Weißfärbung erreicht ist und dass dann alle relevanten Moleküle in den koagulierten Zustand übergegangen sind. Für diesen Fall wird definiert, dass Omega des Arrhenius' Schadensintegrals den Wert 1 annimmt (Birngruber et al. 1985).

$$\Omega = A \int_0^{\tau} \exp \left[\frac{-\Delta E}{R \cdot T(t)} \right] dt,$$

Abbildung 1: Schadensintegral nach Arrhenius

Das Schadensintegral Ω nach Arrhenius ist dimensionslos.

A [1/s] ist ein Frequenzfaktor, ΔE [J/mol] ist die Aktivierungs-energie, T [K] steht für die absolute Temperatur, τ [s] stellt die Dauer der Hitzeeinwirkung dar und R [J/mol/K] ist die universelle Gaskonstante.

Die Arrheniusgleichung enthält Parameter, welche nicht vorhersagbar waren (A und ΔE). Diese wurden in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe bestimmt. Die Auswertung von ca. 1000 über- und unterschwelligen Läsionen erfolgte hinsichtlich des Schwellenkriteriums „Sichtbarkeit im Fundusfoto nach 1 Stunde“. Zu jeder Zeit- Durchmesser- Kombination wurde mittels Probitanalyse die optoakustische Schwelle bestimmt, bei der mit 50- bzw. 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit eine funduskopisch sichtbare Läsion entsteht. Für jeden Bestrahlungsdurchmesser wurden für mehrere Bestrahlungszeiten die zugehörigen Temperaturwerte bestimmt. Rechnerisch erfolgte anschließend die Herleitung der zu diesen Daten passenden Arrheniuskurve, wobei sich die Aktivierungsenergie ΔE auf 273 kJ/mol belief. Damit lässt sich die Temperaturschwelle für jede beliebige Bestrahlungszeit berechnen (Schlott et al., 2012), worauf der Algorithmus zur automatischen Bestrahlungszeitregelung des Lasers beruht.

1.4.2 Grundlage der automatischen Dosiskontrolle: Die adaptierte Arrheniuskurve

Unter diesen Annahmen modelliert diese Gleichung den Zusammenhang von Temperatur, Expositionszeit und dem entstehenden Schaden. Anhand dieser Gleichung ist die Berechnung des entstehenden Gewebeschadens als Zeit- Temperaturfunktion möglich (Birngruber et al. 1985).

Die in Abb. 2 dargestellte Kurve repräsentiert eine beliebige Zeit- Temperaturfunktion, die zu einem konstanten und für diese Kurve spezifischen Gewebeschaden führt. Sie modelliert die intuitiv verständliche Tatsache, dass zum Erreichen eines gleichen Schadens in kürzerer Zeit eine höhere Temperatur notwendig ist als bei längeren Expositionszeiten. So benötigen Bereiche der Retina, die aufgrund ihrer starken Pigmentierung und somit höherer Absorptionsfähigkeit einer stärkeren Temperaturerhöhung ausgesetzt sind, eine kürzere Bestrahlungszeit als schwächer pigmentierte Regionen. Und schwächer absorbierende Areale benötigen eine längere Bestrahlungsdauer bei gleicher Laserausgangsleistung, bis der gewünschte Effekt erreicht ist.

Eine vertikale Verschiebung der Kurve führt zu einer Modifizierung der Läsionsintensität. So ergibt eine höher verlaufende Kurve kräftigere Läsionen, eine tiefer verlaufende Kurve ergibt schwächere Läsionen. Soll eine sanfte Läsion produziert werden, so bedarf es eines insgesamt niedrigeren Temperaturniveaus, welches nach einem steilen Anstieg bereits in kürzerer Zeit erreicht werden kann (IV).

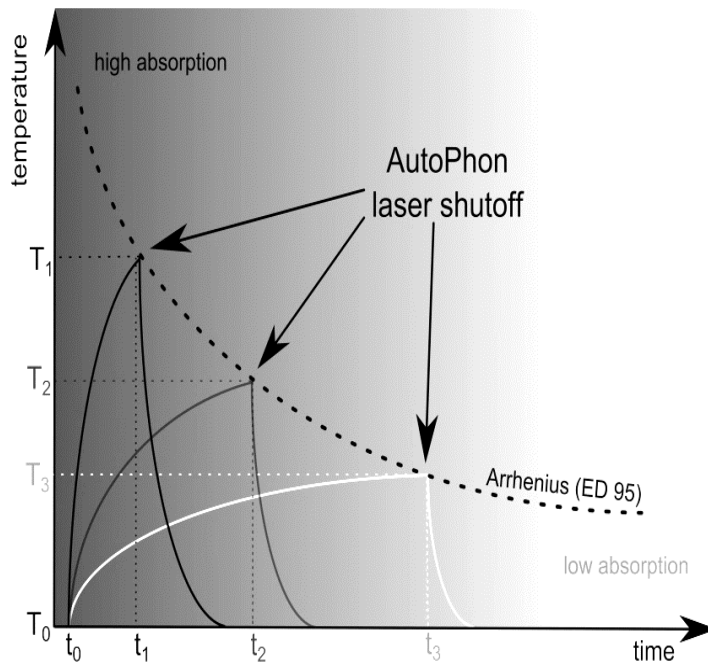


Abbildung 2: Adaptierte Arrheniuskurve

Repräsentativ dargestellt ist eine exemplarische Zeit-Temperaturfunktion, die zu einem konstanten und für diese Kurve spezifischen Gewebeschaden führt. Jede Läsion, die durch eine der vielen möglichen Temperatur-Zeit-Kombination dieser Kurve entsteht, hat dieselbe Intensität. Bereiche mit einer starken Pigmentierung verfügen über eine höhere Absorptionsfähigkeit und sind einer stärkeren und zügigeren Temperaturentwicklung ausgesetzt. Ihre Bestrahlungszeit fällt somit kürzer aus, um die gleiche Intensität zu erreichen als eine schwächer pigmentierte Region. Eine Verschiebung der Kurve anhand der vertikalen Achse führt zu schwächeren bzw. stärkeren Läsionen.

ED 95 bezieht sich auf die Effektdosis: bei 95% der Laserherde tritt das definierte Kriterium der funduskopischen Sichtbarkeit nach 1 Stunde ein.

Bei Steuerung des Lasers anhand dieser Zeit-/ Temperaturkurven erfolgt die Regulation der Bestrahlungszeit automatisiert mit Erreichen der jeweiligen Sollintensität des gewünschten Schadens (Koinzer et al., 2012). Damit verfügt man über ein Verfahren, welches in der Lage ist, gleichmäßige und vorhersagbare Koagulationsherde zu produzieren. Die zitierte Studie unserer Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass die automatische Dosiskontrolle möglich ist. Es gelang, eine sanfte Läsionsstärke reproduzierbar zu erzeugen, welche unabhängig war von den jeweils vorherrschenden individuellen anatomischen Gegebenheiten.

1.5 FRAGESTELLUNGEN DIESER ARBEIT

Liefert die automatische, temperaturkontrollierte Photokoagulation gleichmäßige Läsionen in unterschiedlichen, vorwählbaren Intensitäten?

Nachdem es unserer Arbeitsgruppe gelang, unter Anwendung des beschriebenen Laserverfahrens eine einzige sanfte Läsionsstärke zu erzeugen, soll im Rahmen der hier präsentierten tierexperimentellen Arbeit untersucht werden, ob auch eine verlässliche Reproduktion unterschiedlich starker, prospektiv gewählter Läsionsintensitäten mit diesem Verfahren möglich ist.

Die Spannweite der Läsionsintensitäten soll von funduskopisch unsichtbar bis eindeutig überschwellig reichen, um sowohl dem unterschwelligen Bereich als auch dem üblichen therapeutischen Bereich zu entsprechen.

Anhand welcher Merkmale lassen sich Läsionen unterschiedlicher Intensität an der Kaninchenretina in der OCT objektivieren?

Es wird eine detaillierte OCT- morphologische Klassifikation der Läsionen anhand ihrer spezifischen retinalen Veränderungen erarbeitet. Im Anschluss erfolgt eine Differenzierung bezüglich ihrer Schadensintensität.

Hiermit soll diese Arbeit einen Beitrag leisten zur Optimierung des Photokoagulationsprozesses und zur Validierung einer temperaturbasierten automatischen Dosiskontrolle. Ziel der wissenschaftlichen Bemühungen soll sein, die prinzipiell destruktive und schmerzauslösende Behandlung für den Patienten verträglicher zu gestalten, bei gleichzeitig erhaltener maximaler therapeutischer Effektivität unter Schonung wichtiger umgebender funktioneller Strukturen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 DER BEHANDLUNGSLASER

Die Photokoagulation der Retina wurde mit einem Lasergerät der Firma Carl Zeiss Meditec AG aus Jena durchgeführt. Es handelt sich um einen modifizierten VISULAS VITE 532s.

Das handelsübliche Gerät verfügt über eine Continuous Wave- Lichtquelle (CW, CW = Dauerstrich), das heißt, es emittiert kontinuierlich Laserstrahlung mit einer Wellenlänge von 532 nm. Damit befindet es sich im grünen Farbspektrum, womit es über gute Absorbtionseigenschaften am Augenhintergrund verfügt. Wie bei der gewöhnlichen Behandlung werden Läsionsgröße und Laserleistung vorab eingestellt. Üblicherweise bestimmt nun der behandelnde Arzt über die Dauer des Bestrahlungszeitraumes. Bei dem modifizierten, um eine optoakustische Temperaturmess- und Rückkoppelungseinrichtung ergänzten Gerät, ist dies nicht der Fall. Das Temperaturmessverfahren ermöglicht in Echtzeit die Erfassung der Temperaturverhältnisse zentral in der entstehenden Läsion. Anhand des selbst entwickelten Steuerungsalgorithmus erfolgt die Regelung der Bestrahlungszeit. Die Abschaltung erfolgt somit automatisch und unabhängig vom Behandler bei Erreichen einer bestimmten Soll-Intensität.

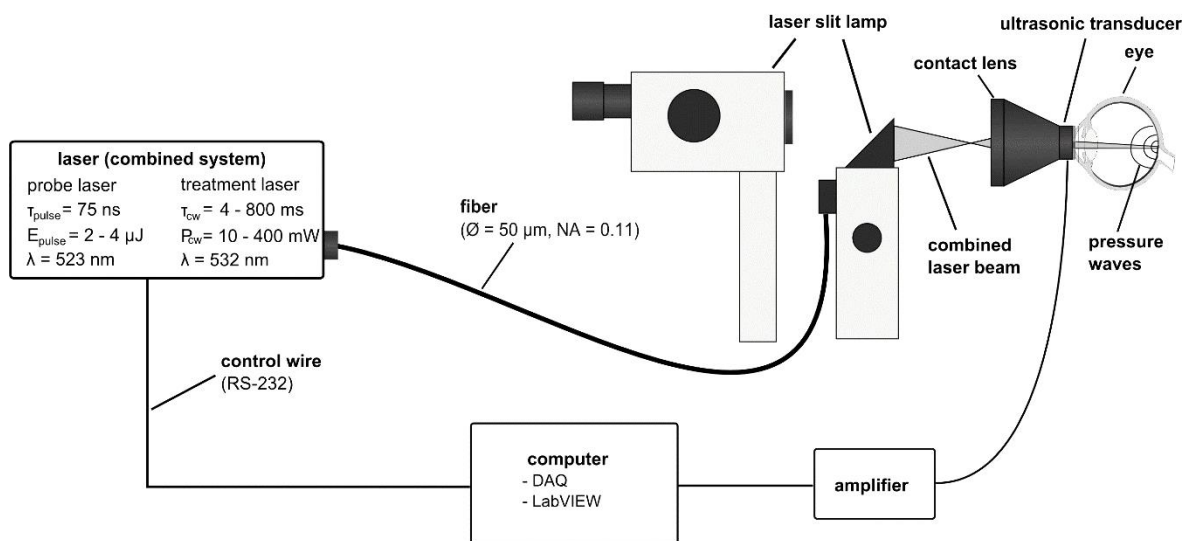


Abbildung 3: Schema des Behandlungssettings

Rechts im Bild ist das zu behandelnde Auge mit dem Kontaktglas dargestellt. Unter ophthalmoskopischer Kontrolle wird ein kombinierter Laserstrahl in das gewünschte Behandlungsareal gelenkt. Die Kombination besteht aus einem Behandlungslaser plus einen gepulsten Messlaser. Die technischen Angaben zu beiden Lasern sind links im Kasten dargestellt: [T] = Pulsdauer, [E] = Energie, [P] = Leistung, [λ] = Wellenlänge. Im Kontaktglas befindet sich ein Transducer, eine Art Ultraschallmikrophon. Der Transducer erfasst Druckwellen, die durch die Erwärmung und Ausdehnung der Retina entstehen. Das Signal wird durch einen Amplifier verstärkt und einem Computer zugeleitet. Über eine D/A-Wandlerkarte liest eine selbst programmierte LabVIEW-Routine die Daten ein und berechnet die Temperaturprofile und dazugehörigen Abschaltzeitpunkte. Dieser Feedback- Algorithmus ist die Basis der automatischen Abschaltung. Über eine RS-232-Schnittstelle kann der Computer den Behandlungslaser ansteuern und den Bestrahlungsvorgang beenden.

2.1.1 Optoakustische Netzhauttemperaturmessung

Das Verfahren zur Temperaturermittlung basiert auf dem physikalischen Prinzip der Optoakustik (Kandulla et al., 2006). Der Begriff ‚Optoakustik‘ beschreibt die Induktion von Schallwellen durch Licht, wie in Abb. 4 dargestellt.

Koaxial mit dem Behandlungslaser wird ein gepulster Messlaser appliziert, welcher die Optoakustik anregt, ohne Einfluss auf den Behandlungslaser zu nehmen. Die Messfrequenz beträgt 1 kHz. Jeder Messpuls ist ca. 75 ns lang und hat die gleiche Wellenlänge wie der Behandlungslaser, ist jedoch aufgrund der geringen Energie von 2-12 μJ je Puls biologisch unschädlich und führt allein nicht zu einer relevanten Netzhautschädigung. Er induziert die optoakustischen Wellen, indem er durch die kurze Erwärmung und Ausdehnung der Netzhaut eine bipolare Welle auslöst. Diese ist von außen an der Hornhaut messbar. Die Frequenz der optoakustischen Wellen liegt im Ultraschallbereich, für deren Erfassung eine Art Ultraschallmikrophon notwendig ist. Dieser ringförmige Transducer ist im Kontaktglas, einem Mainster Focal Grid- Glas, integriert.

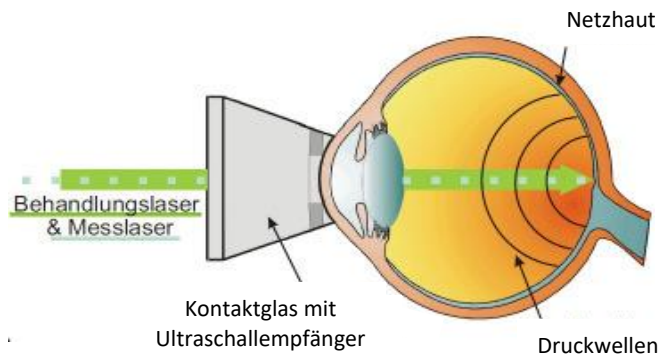


Abbildung 4: Schemazeichnung des behandelten Auges

Das Kontaktglas liegt der Hornhaut auf und die Laserstrahlung wird transpupillär ins Behandlungsareal der Retina geleitet. Sie wird regelmäßig durch einen Messimpuls überlagert, der für die Erfassung der Temperaturentwicklung auf Höhe des RPE notwendig ist. Durch den Messimpuls dehnt sich das retinale Gewebe kurzfristig aus und erzeugt Druckwellen, deren Amplitude von der Temperatur abhängig ist. Das optoakustische Signal korreliert mit dem Temperaturverlauf des bestrahlten Areal. Empfangen werden die Druckwellen durch einen Empfänger (Transducer) im Kontaktglas.

Die Temperaturverteilung im Zielgebiet ist räumlich inhomogen. Die Spitzentemperatur befindet sich zentral in der Mitte des bestrahlten Areal auf Höhe des RPE, wo die eingestrahlte Energie absorbiert wird. Lateral davon ist ein Temperaturabfall zu verzeichnen. Die Spitzentemperatur wird am Ende des Bestrahlungsvorganges erreicht. Mit Einwirken des Behandlungslasers kommt es über den Temperaturanstieg an der Netzhaut zur Veränderung des optoakustischen Signal. Über die Wärmeleitungsgleichung lässt sich die Temperatur für jede beliebige Stelle im Zielvolumen ermitteln (Kandulla et al., 2006).

Diese Methode macht es möglich, die Temperaturentwicklung an der Netzhaut, zentral in der entstehenden Läsion, indirekt zu bestimmen und zwar zeitlich hochauflösend, nicht-invasiv und in Echtzeit. Da Mess- und Behandlungslaser mit gleicher Wellenlänge koaxial auf dieselbe Netzhautstelle fallen, findet die Temperaturmessung im gleichen Gewebevolumen statt, in dem auch die Behandlungsstrahlung absorbiert wird.

2.1.2 Automatische Effektsteuerung durch Echtzeit- Temperatur- Rückkopplung

Vor jeder Einzelkoagulation findet eine Kalibrierung des Optoakustiksignals auf die ortsspezifischen Gegebenheiten statt. Es werden zunächst 20 Messlaserpulse ohne Behandlungsstrahlung in das Zielgebiet geleitet. Das hierbei durch den Transducer erfasste optoakustische Signal dient als Referenzsignal. Es korrespondiert zur Ausgangstemperatur an der Netzhaut, welche der Körpertemperatur annähernd entspricht.

Die Amplitude der optoakustischen Wellen ist von der Netzhauttemperatur abhängig (vergl. Abb.5 links). Erfolgt die Absorption des Laserimpulses im kalten Gewebe, entsteht ein schwaches optoakustisches Signal; erfolgt die Absorption im warmen Gewebe, nimmt die Amplitude der optoakustischen Welle zu. Bei einer Erwärmung des Zielgebietes durch Laserstrahlung korreliert das optoakustische Signal mit dem Temperaturanstieg des bestrahlten Netzhautareals. Um die Amplitudenänderungen der optoakustischen Signale in einen Temperaturanstieg umzurechnen, ist es nötig den Gewebeexpansionskoeffizienten zu kennen. Dieser wurde experimentell in Vorversuchen bestimmt.

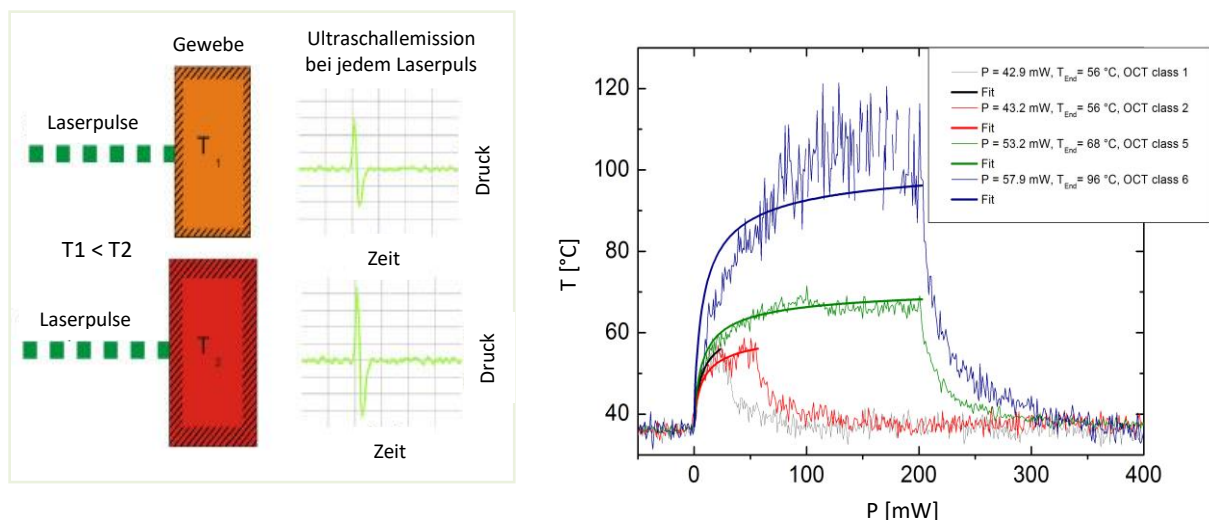


Abbildung 5: Entstehung optoakustischer Daten

Links: Nach Eintreffen des Messlaserpulses im Gewebe entsteht eine Ultraschallemission. Die Druckwellenamplituden ändern sich in Abhängigkeit zur Netzhauttemperatur. Je höher die Temperatur im Zielgebiet, desto größer die Amplitude dieses optoakustischen Signals. (Abb.: JBO, Kandulla et al., 2006)

Rechts: Zur Darstellung kommen optoakustische Rohdaten (dünne Linien) sowie die dazugehörigen per Exponentialfit angeschmiegt Funktionen (dicke Linien) der physikalisch zu erwartenden Temperaturentwicklung im zeitlichen Verlauf der Läsionsentstehung. Bevor die eigentliche Behandlungsstrahlung zugelassen wird, findet eine Kalibrierung statt. Mit 1000 Messpulsen pro Sekunde wird die Netzhauttemperatur während der Bestrahlung anhand der sich verändernden Ultraschallamplituden rechnerunterstützt ermittelt. Die farbliche Kodierung gibt Rückschlüsse auf die Läsionsintensität: funduskopisch unsichtbar: grau, schwach: rot, mäßig: grün, kräftig: blau.

Aus den erfassten Optoakustikdaten lässt sich der Temperaturverlauf berechnen und in einen durch unsere Arbeitsgruppe entwickelten Steuerungsalgorithmus für den Photokoagulationslaser überführen. Hierauf erfolgt die Abschaltung des Lasers und damit die Beendigung des Bestrahlungsvorganges.

Erwartet wird die Entstehung temperaturkontrollierter Läsionen, bei welchen die Regelung der Expositionszeit herdividuell auf die gewünschte Effektstärke erfolgt. Die so entstehenden Läsionen verfügen über eine für sie charakteristische Kombination aus Temperaturendpunkt und Applikationszeit, entsprechend ihrer Arrheniuskurve.

2.2 DER VERSUCHSAUFBAU

2.2.1 Der Tierversuch

Die Photokoagulation wurde im Rahmen dieser Studie an sechs Augen von drei erwachsenen weiblichen Kaninchen der Rasse Chinchilla Bastard durchgeführt. Die Namensgebung erfolgte individuell als „Jasmin Jr.“, „Lola“ und „Alexis Dionysus“. Alle Versuche und bildgebenden Untersuchungen fanden in Narkose statt. Als Narkotika verabreichten wir intramuskulär Ketamin 10 % (0,5- 0,7 ml/kg KG) und Xylazin 2 % (0,2- 0,25 ml/kg KG). Zur Narkoseverlängerung wurde bedarfsweise eine halbe Dosis dieser Medikamente intraperitoneal nachinjiziert. Als Mydriatika wurden Phenylephrin 5 %- und Tropicamid 5 %- haltige Augentropfen verwendet. Bei ausreichender Narkosetiefe erfolgte die Lagerung des Kaninchens auf einem speziell angefertigten, in allen Raumachsen stufenlos verstellbaren Versuchstisch. Dieser bot zusätzlich eine Befestigungsmöglichkeit für das Kontaktglas. Mit zweiprozentigem Methylzellulosegel wurde dieses aufgebracht und mechanisch fixiert. Es verhindert den Lidschluss, dämpft die Augenbewegungen und ermöglicht optimalen Einblick und Vergrößerung. Im Anschluss an die Photokoagulation erfolgten die fotografischen Aufnahmen, welche weiter unten beschrieben werden.

Nach Versuchsende wurde das erwachte Kaninchen in eine Isolationsbox gesetzt, verweilte dort über Nacht, und wurde am nächsten Morgen nach orientierender veterinärärztlicher Untersuchung zu den anderen Tieren in den Laufstall entlassen. Für die Dauer der Versuche erfolgte die Haltung in den Tierställen der Universitätsklinik Schleswig-Holsteins, Campi Kiel und Lübeck. Sowohl die Unterbringung und Pflege, als auch der Versuchsaufbau und die Umsetzung entsprechen den aktuellen Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes. Genehmigende Zustimmung erhielt das Vorhaben durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume der Landesregierung Schleswig- Holsteins, Kiel; Antragsnummer: V312-7234.121-11 (siehe Anhang).



Abbildung 6: Setting Tierversuch

Bereits narkotisiertes und auf dem Versuchstisch gelagertes Kaninchen, das aufgesetzte Kontaktglas ist mechanisch fixiert. Das Kaninchen ist bereit zur Photokoagulation.

2.2.2 Die Photokoagulation - Kontrollläsionen versus TTC- Läsionen

TTC- Lesion = ‚Time-Temperature-Characteristic-Lesion‘

= Temperaturkontrollierte, automatisch gesteuerte Läsionen

In den sechs Augen wurden insgesamt 1022 Laserherde appliziert. Diese wurden jeweils in Spalten auf der Kaninchenretina angeordnet, so dass mehrere Läsionen, d.h. 6- 19 Herde, je nach Lage im runden Einblickfeld, mit gleichen Parametern untereinander zu liegen kamen. Vier bis sechs Spalten bildeten jeweils eine Abteilung, welche mit gleicher Ausgangsleistung appliziert wurde, z.B.: Spalte 1- 5 mit 57 mW, siehe Abb. 7 (II).

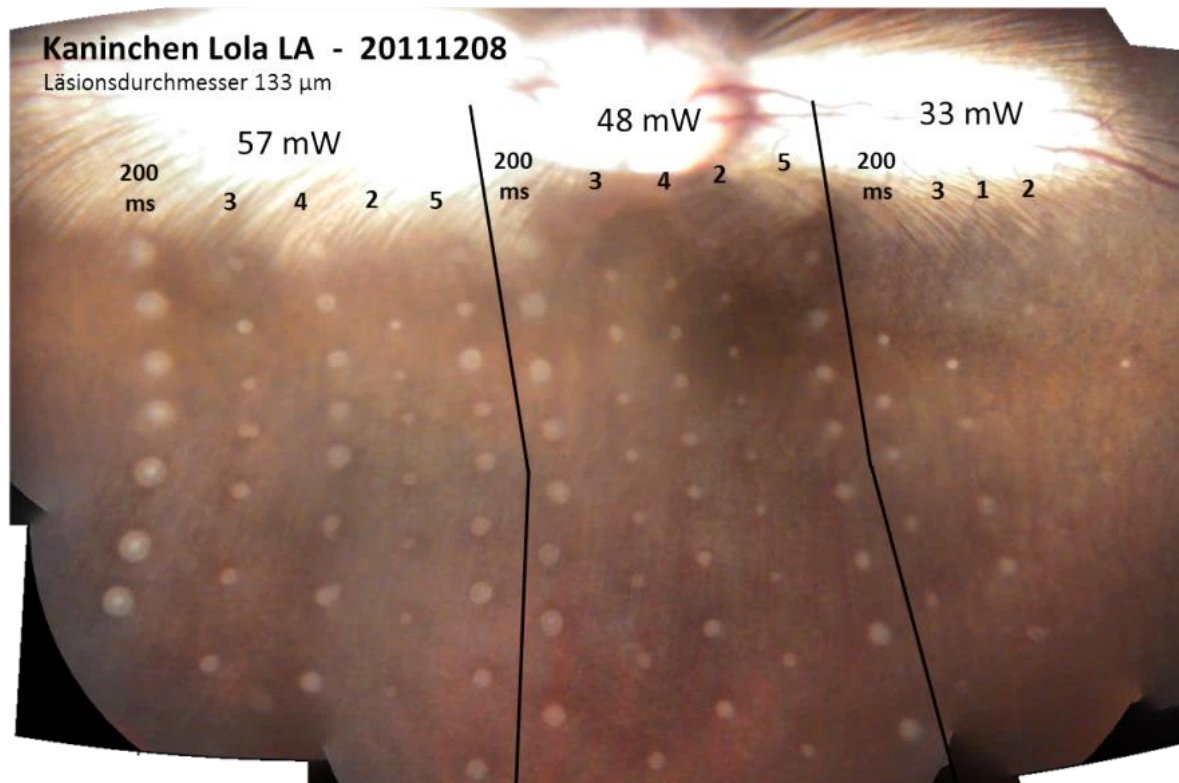


Abbildung 7: Panoramaaufnahme des linken Auges (LA) von Kaninchen „Lola“

Versuchsreihe mit drei Abteilungen unterschiedlicher Laserausgangsleistungen. Jeweils links gelegen die Spalten der Kontrollläsionen mit einer festen Expositionszeit von 200 ms und parallel dazu verlaufend Läsionen unterschiedlicher Intensitätsstufen, welche unter Anwendung der temperaturkontrollierten automatischen Abschaltung appliziert wurden. Die Läsionen zeigen innerhalb ihrer jeweiligen Gruppe homogene Ergebnisse bezüglich ihres Ausprägungsgrades.

Der Bestrahlungsdurchmesser betrug 200 µm in der Luft und aufgrund der optischen Eigenschaften 133 µm auf dem Kaninchenfundus. Die Laserleistung variierte von 20- 65,7 mW. Die Expositionszeiten betrugen entweder fest 200 ms oder 7- 800 ms bei variabler Expositionszeit.

Läsionen mit einer festen Expositionszeit von 200 ms stellen Kontrollläsionen dar. Sie entsprechen den Standardläsionen, wie sie in der klinischen Routine verwendet werden.

Läsionen, welche unter Anwendung der automatischen Abschaltung appliziert wurden, werden als TTC- Läsionen bezeichnet. TTC steht für ‚Time-Temperature-Characteristic-Lesion‘. Die Abschaltung dieser Läsionen erfolgte temperaturkontrolliert, so dass die

Expositionszeit herdindividuell auf die jeweilige Sollstärke geregelt wurde. Mit Zunahme ihres Zahlenwertes (TTC 1 - TTC 5) sollen diese Läsionsgruppen von ansteigender Intensität sein, entsprechend einer vertikalen Verschiebung der Arrheniuskurve (vergl. Abb. 2). Ihre Intensität soll von funduskopisch unsichtbar bis eindeutig überschwellig reichen, um sowohl dem üblichen therapeutischen Bereich abzudecken, sowie dem funduskopisch unsichtbaren Bereich zu entsprechen.

2.3 BILDICHE DOKUMENTATION

Die bildliche Dokumentation erfolgte mit Fundusfarbfotographien und optischer Kohärenztomographie (OCT). Am Behandlungstag (Tag 1) wurden die Aufnahmen binnen 2- 3 Stunden nach der Behandlung gemacht. Die nächsten Aufnahmen erfolgten am Tag 7, dann einen Monat und abschließend drei Monate nach Versuchsende (II, IV).

2.3.1 Fundusfarbfotographie

Für die Fundusfarbfotographien wurde eine VISUCAM® 500 von Carl Zeiss Meditec AG, Jena, verwendet. Die einzelnen Fundusfarbfotographien wurden unter Zuhilfenahme der freien Software HUGIN zu einer Panoramaaufnahme zusammengefügt. In den so gewonnenen Panoramaaufnahmen wurden für jedes Kaninchenauge die Läsionsspalten entsprechend der Behandlungsparameter beschriftet und die Läsionen kartographiert, wie in Abb. 7 dargestellt. So entstanden die notwendigen Funduskarten, um die Einzelherde im weiteren Verlauf der Datenerhebung aufzufinden und identifizieren zu können.

Vermessung der Laserherde am Funduspanorama

Als Grundlage zum Vermessen der Läsionen diente das Panoramabild vom Tag 1. Drei voneinander unabhängige Untersucher markierten alle für sie sichtbaren Läsionen, indem sie den Außenrand unter Verwendung des Bildbearbeitungsprogrammes GIMP (www.gimp.org) mit einer Linie umfuhren und ausschnitten. Es galt, nur die Koagulationszonen, unter Einschluss des denaturierten Areals und den gegebenenfalls sichtbaren Nekrosekern zu erfassen; unter Ausschluss von ödematösen Höfen (vergl. Abb. 8), die sich als Sekundärererscheinung entwickeln können.

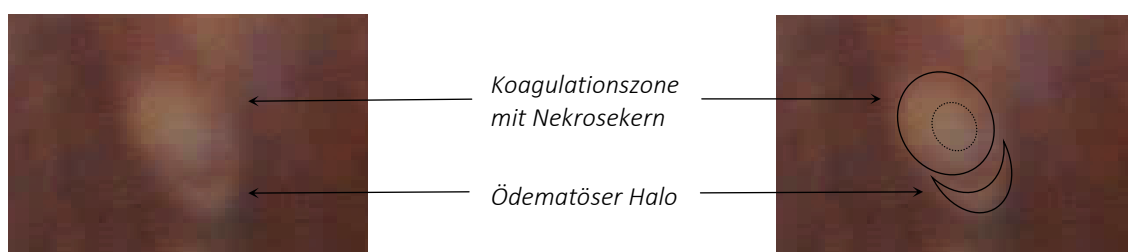


Abbildung 8: Begleiterscheinungen an einer Läsion nach der Photokoagulation

Funduskarte „Jasmin jr.“, RA, 2 Std. nach Applikation, Spalte 23, Herd 9.: Demonstriert werden typische Läsionserscheinungen nach Photokoagulation. Mittig in der Koagulationszone liegt, hier schwach sichtbar, der Nekrosekern. Rechts unten an die Läsion angrenzend zeigt sich ein halbmondförmiger ödematöser Halo, der als Sekundärererscheinung auftreten kann. Dieser wurde bei den Messungen nicht berücksichtigt und ausgeschlossen.

Die Sichtbarkeit einer Läsion galt als bestätigt, wenn mindestens zwei der drei Untersucher den Laserherd erkannten. Ansonsten wurde der Herd als funduskopisch unsichtbar eingestuft. Die Pixelgröße aller so markierten Läsionen wurden halbautomatisch mit der Software IMAGE J vermessen (www.rsbweb.nih.gov/ij).

In Vorversuchen wurde der für die Umrechnung von Pixel in μm notwendige Umrechnungsfaktor bestimmt. Es wurden je fünf kreuzförmig angeordnete Laserherde in mehreren Kaninchenaugen appliziert und gemessen (vergl. Abb. 9). In die Berechnung der Läsionsgröße flossen die optischen Eigenschaften des Kontaktglases mit ein, also in die Annahme, dass ein $500\text{ }\mu\text{m}$ großes Bestrahlungsareal auf dem Kaninchenfundus $333\text{ }\mu\text{m}$ groß abgebildet wird. Die Herde wurden Rand an Rand positioniert, der Mittenabstand der beiden äußeren Herde betrug $666\text{ }\mu\text{m}$ und diente als Referenzmaß zur Bildskalierung. Der Umrechnungsfaktor beträgt $9,5 \pm 0,7\text{ }\mu\text{m}$ pro Pixel für die VISUCAM von Zeiss mit einem Mainster Focal Grid- Kontaktglas am Kaninchen (III).

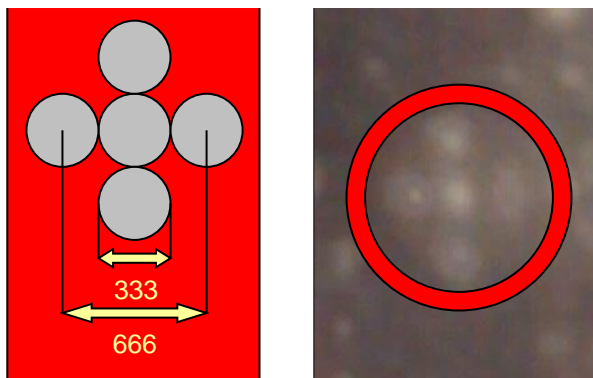


Abbildung 9: Kalibrierkreuz

Im Fundusfoto zeigt der rote Kreis das aus fünf Läsionen bestehende Kalibrierkreuz aus den Vorversuchen zur Ermittlung des Skalierungsfaktors. Links die schematische Darstellung dazu, mit Angabe des Durchmessers und Mittenabstand, dies diente als Referenzmaß zur Bildskalierung. Für die VISUCAM von Zeiss mit einem Mainster Focal Grid- Kontaktglas ergab sich ein Umrechnungsfaktor von $9,5 \pm 0,7\text{ }\mu\text{m}$ für Versuche am Kaninchen.

2.3.2 Optische Kohärenztomographie (OCT)

Zum Einsatz kam ein HRA + OCT SPECTRALIS® der Firma Heidelberg Engineering. Die optische Kohärenztomographie (OCT) erzeugt einen hochauflösenden optischen Querschnitt der retinalen Schichten. Dazu wird ein Laserstrahl optisch geteilt und auf einen Referenzarm im Gerät sowie einen Analysearm transpupillär auf die Retina projiziert. Das reflektierte Licht beider Arme wird interferometrisch analysiert und gibt als A- Scan Auskunft über die Tiefenbeschaffenheit der Retina. In einer Reihe gewonnene A- Scans werden zu einem zweidimensionalen Bild aneinandergesetzt (B- Scan). Mehrere nebeneinanderliegende B- Scans ergeben ein dreidimensionales Modell der Netzhaut. Zusätzlich zur tomographischen Schnittaufnahme erzeugte das Gerät automatisch ein Infrarot (IR)- Aufsichtsbild, in das die Lage der Schnittebene eingezeichnet wurde. Das Gerät verfügt über eine AutoRescan™ Funktion: Das Gebiet der Referenzuntersuchung wird automatisch durch das Gerät in den Folgeuntersuchungen wiedergefunden und über eine Serienfunktion der Gerätesoftware mit allen Serienbildern der Reihe verknüpft.

Identifikation einer Läsion

Das gewünschte Untersuchungsareal wurde in 30 µm breiten Schichten gescannt. Um eine hohe Bildschärfe zu erhalten, wurde in jeder Scanebene 20 Wiederholungen eines Einzelscans gemittelt. Es war notwendig für die bestmögliche Abdeckung des Bestrahlungsfeldes, mehrere Areale an einem Auge überlappend zu scannen. Diese erfassten Areale wurden in die Funduskarten eingezeichnet. Nun war bei der Durchsicht der einzelnen Ebenenscans eines Areals eine eindeutige Identifikation jedes Herdes möglich. Das genaue Vorgehen ist in Abbildung 10 detailliert erläutert.

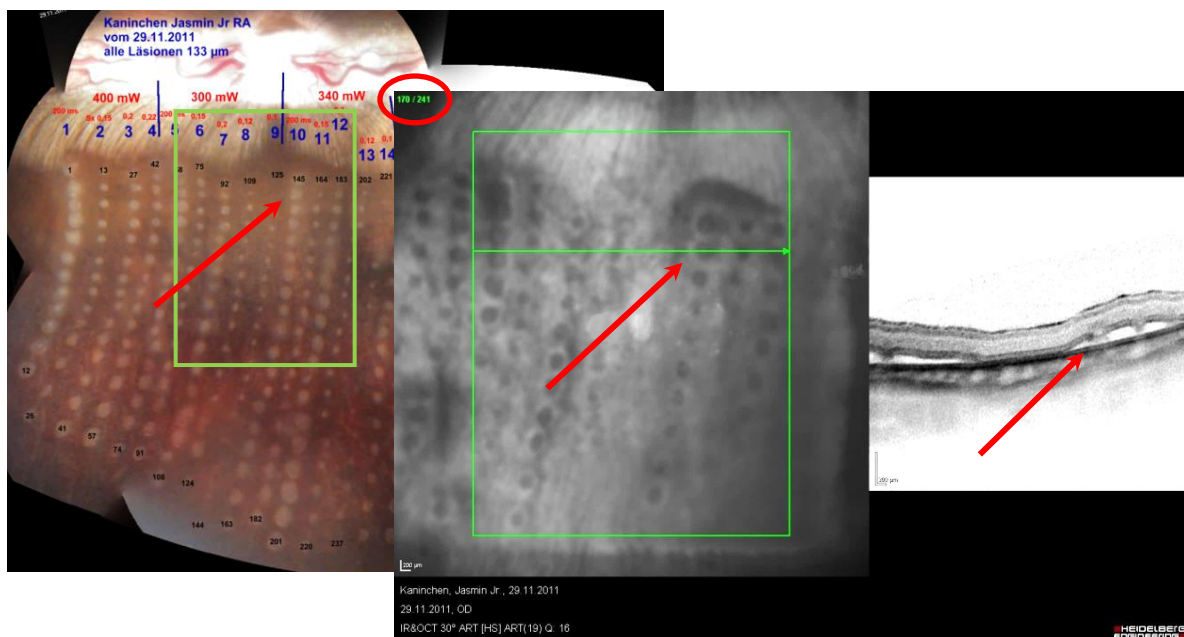


Abbildung 10: Identifikation und Export: Erklärung des Prinzips anhand der Läsion Nr. 146
„Kaninchen „Jasmin Jr.“ - RA - Tag 1 - Herd Nr. 146 - Schnittebene 170“

Zum Auffinden eines Herdes wurde die Funduskarte mit dem zuvor eingezeichneten OCT- Areal verwendet. Dann erfolgte die Zuordnung der Spalten im Infrarotbild des OCTs entsprechend der Spaltennummerierung der Funduskarte. In den 241 möglichen Ebenen einer OCT wurden die einzelnen Herde einer Spalte aufgesucht und jeweils in der Ebene vermessen, welche den Herd mit dem größten Durchmesser darstellt.

Mit einem roten Pfeil ist die Läsion Nr. 146 markiert. In der Funduskarte (links) befindet es sich in Spalte 10 als zweiter Herd von oben. Der grüne Rahmen entspricht dem gescannten OCT-Areal. Dann erfolgt die Übertragung in das Infrarotbild (mittig). In den 241 Ebenen dieser Serie befindet sich der größte Läsionsdurchmesser in Ebene 170. Der rote Kreis zeigt die fortlaufende Nummer der aktuellen Schnittebene und die Gesamtzahl der Schnittebenen dieser Serie. Rechts ist das zugehörige OCT-Bild zu sehen, in welchem der Herd identifiziert werden konnte und vermessen wird.

Export und Überführung der Läsionen in die Verlaufsdocumentation

Nach sicherer Identifikation einer jeden Läsion erfolgten digital der Bildexport und die Überführung des OCT- Schnittbildes in die Verlaufsdocumentation. Der Export eines B-Scan- Bildes fand als Pixelgrafik statt, mit Hilfe der Software GIMP wurde der Herd ausgeschnitten und archiviert. In einer PowerPoint® Präsentation wurden alle in der OCT erfassten Herde, mit ihren morphologischen Veränderungen im zeitlichen Verlauf, als Bildtafeln dargestellt.

Jasmin Jr. · RA · Spalte 10 · Herd 146

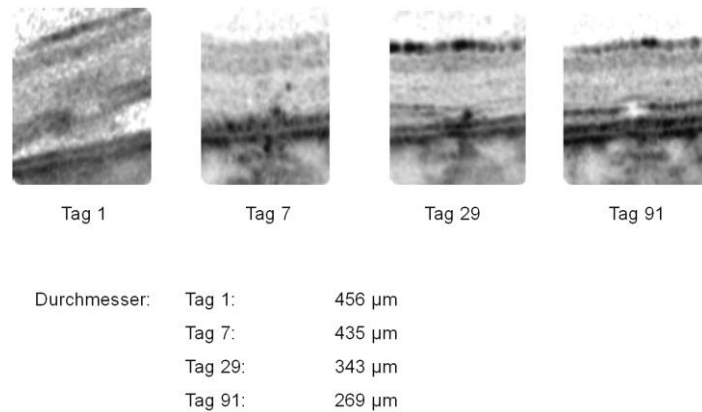


Abbildung 11a: Verlaufsdokumentation I

Beispielfolie aus der PowerPoint-Präsentation zur Darstellung der morphologischen Veränderungen eines einzelnen Herdes im zeitlichen Verlauf über alle Beobachtungszeitpunkte mit Angabe der Läsionsdurchmesser.

Es gab zwei Formen der Verlaufsdokumentation. Zum einen eine Dokumentation bezogen auf jeden Einzelherd und seine jeweiligen Verlaufsbilder zu den vier Beobachtungszeitpunkten mit Angabe der jeweils erfassten Durchmesser (vergl. Abb. 11a).

Hd:	145	146	147	148	149	150
Tg 1						
Tg 7						
Tg 29						
Tg 91						

Abbildung 11b: Verlaufsdokumentation II

Jasmin Jr. - RA - Spalte 10 - Herd Nr. 145- 150 - 340 mW - 200 ms

Beispielfolie aus der Tabelle zur visuellen Gegenüberstellung von Läsionen mit gleicher Bestrahlungsleistung und gleichen Abschaltparametern. Auf den Panoramaaufnahmen sind sie in Spalten angeordnet. Es handelt sich um Kontrollläsionen, welche ohne die temperaturgesteuerte Abschaltung appliziert wurden, mit einer festen Bestrahlungsdauer von 200 ms. Sie entstammen dem rechten Auge (RA) des Kaninchens „Jasmin Jr.“. Die Läsionen befinden sich in Spalte 10, es handelt sich um Herd Nr. 145- 150 und sie wurden mit einer Leistung von 340 mW appliziert.

Parallel hierzu wurde eine tabellarische Gesamtübersicht erstellt, in welcher die Läsionen mit gleicher Bestrahlungsleistung und den gleichen Abschaltparametern nebeneinander zur Darstellung kamen (vergl. Abb. 11b). Diese Tabelle und die dort sichtbaren Veränderungen sind die Grundlage für die Klassifikation der Läsionen. Anhand der dort sichtbaren morphologischen Merkmale wurden die Laserherde in Gruppen ähnlicher Schadensintensität sortiert und eingeteilt. Im weiteren Verlauf entstand hieraus die Kategorisierung und die detaillierte Läsionsbeschreibung, wie in den Ergebnissen ausführlich dargestellt.

Vermessung der Laserherde in der OCT

Nach sicherer Identifizierung einer Läsion wurde der größte lineare Durchmesser (GLD = greatest linear diameter) gemessen. Alle B- Scan- Ebenen, die einen Herd zeigten, wurden gesichtet und die Ebene zur Messung verwendet, in welcher der Herd den größten Durchmesser hatte. Die Messung fand stets in der gleichen Netzhautschicht statt: der Inner segment (IS)- Outer segment (OS)- Junction Line, also der Trennlinie zwischen den inneren und äußeren Photorezeptoraußensegmenten. Nach der aktuellen Nomenklatur wird die IS-/OS- Junction Line als Ellipsoide Zone bezeichnet (Staurenghi et al., 2014), vergl. bitte die Histiosynopse der Retina, Abbildung 13.

Die axiale Auflösung der OCT- Bilder ist viermal höher als die laterale, so dass in der Standardeinstellung der Gerätesoftware („1:1 Pixel“) die Netzhaut vierfach überhöht und zur Darstellung kam (I). Als Alternative ließ sich eine „1:1 μm “-Darstellung auswählen, in welcher die Schnittbilder in den anatomisch korrekten Proportionen angezeigt wurden. In Abbildung 12 wird dies nochmal im direkten Vergleich zur Histologie verdeutlicht. Die Vermessung der einzelnen Läsionen fand ausschließlich in der größenrichtigen Darstellung statt.

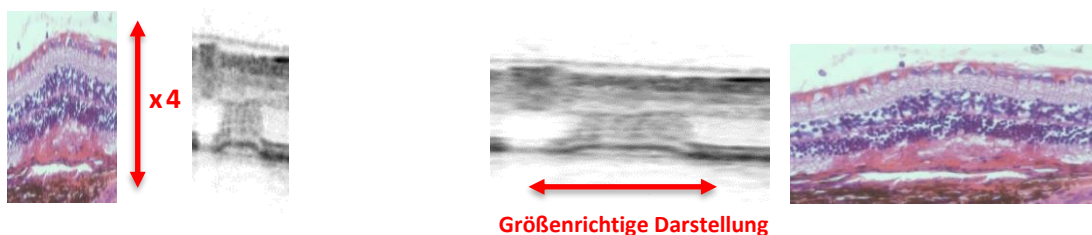


Abbildung 12: Darstellung: OCT versus Histologie

Links in der Abbildung die Darstellung in 1 : 1 Pixel, rechts in 1 : 1 μm . Die axiale Auflösung der OCT-Bilder ist 4 x höher als die laterale, so dass die Netzhaut vierfach überhöht erscheint. Es muss eine andere Darstellungsform in μm gewählt werden, um anatomisch korrekte Proportionen zu erhalten, dieses ist im Programm einstellbar. In dieser Einstellung fand dann die Vermessung der Läsionsdurchmesser statt.

Histiosynopse der Retina

Die folgende Darstellung zeigt die Anatomie der Retina im histologischen Schnittpräparat im Vergleich zur Bildgebung in der OCT und als schematische Darstellung. Darüber hinaus sind die Abkürzungen der einzelnen Schichten aufgeführt, sowie die ausgeschriebene Nomenklatur.

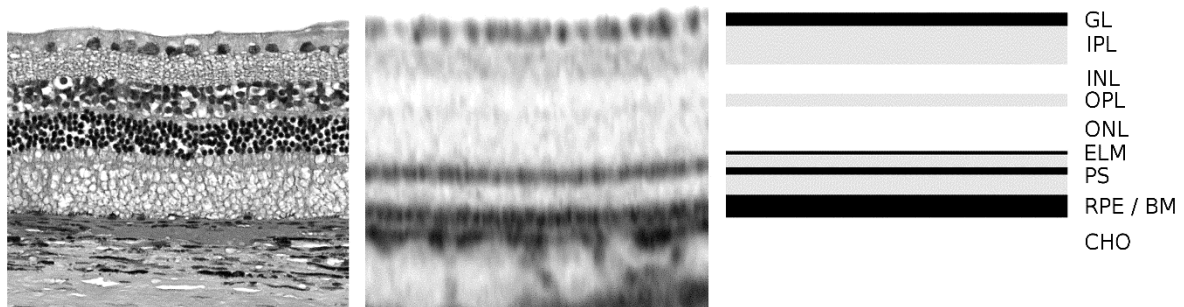


Abbildung 13: Histiosynopse der Retina

Links: Histologie, Mitte: OCT- Aufnahme, Rechts: Graphische Darstellung

CHO: Choriokapillaris, RPE/ BM: Retinales Pigment Epithel/ Bruch'sche Membran, PS: Photorezeptorsegmente mit IS und OS: Inner Segment- bzw. Outer Segment unterteilt durch die IS-OS- Junction Line (nach aktueller Nomenklatur: EZ: Ellipsoide Zone) , ELM: External Limiting Membrane = Membrana limitans externa, ONL: Outer Nuclear Layer = Äußere Körnerschicht, OPL: Outer Plexiform Layer = Äußere plexiforme Schicht, INL: Inner Nuclear Layer = Innere Körnerschicht, IPL: Inner Plexiform Layer = Innere plexiforme Schicht, GL: Ganglion Cell Layer = Ganglienzellschicht mit Nervenfasern.

2.4 STATISTIK

Sämtliche Parameter und Durchmesser sind standardisiert in einer tabellarischen Übersicht zusammengetragen worden, genutzt wurde die Software Microsoft Excel®. Für die analytischen und statistischen Berechnungen wurden die Daten in die Software SPSS® (Version 20, IBM GmbH, Ehningen) exportiert.

Für den Vergleich zweier kategorialer Merkmale, zum Beispiel OCT- Schadensklasse und funduskopische Sichtbarkeit, wurde Fisher's- Exact- Test verwendet. Die p- Werte wurden auf Basis einer Monte- Carlo- Simulation mit 10.000 Stichproben errechnet.

Der Zusammenhang von kategorialen Variablen, z.B. OCT- Schadensklasse, und stetigen Größen, z.B. Läsionsdurchmesser in der Funduskopie und in der OCT, sowie Temperatur, wurde für jede Variable einzeln nicht- parametrisch getestet unter Verwendung eines Kruskal- Wallis- Testes mit anschließender Post- Hoc- Analyse (Wilcoxon- Rangsummen- Test).

In der Gruppe der Standardläsionen (Expositionsdauer 200 ms) wurde der Zusammenhang von OCT- Schadensklasse und Temperatur der Retina mit einer univariaten ANOVA getestet. Hierbei wurde als zusätzlicher Einflussfaktor das individuelle Kaninchenauge getestet mit einer Scheffé Post- Hoc- Analyse.

Alle Testungen wurden zweiseitig durchgeführt. P- Werte aus multiplen Tests wurden mittels der Bonferroni- Methode adjustiert. Als statistisch signifikant wurden p- Werte unterhalb von 0,05 angenommen.

3. ERGEBNISSE

Insgesamt wurden 1022 Laserherde in sechs Kaninchenaugen appliziert: 225 Kontrollläsionen in konventioneller Technik mit einer festen Expositionszeit von 200 ms und 797 Läsionen unter Anwendung der automatischen, temperaturabhängig gesteuerten Abschaltung. In drei Fällen kam es zu Kalibrierungsfehlern, so dass diese drei Läsionen aus der Studie ausgeschlossen wurden. Für 626 Läsionen konnten OCT-Bilder generiert werden, von 464 Läsionen wurde ein vollständiger Datensatz gewonnen, mit bildlicher Dokumentation zu jedem der vier Evaluationszeitpunkte.

Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit werden in der gesamten Arbeit die **OCT-Schadensklassen** und **TTC-Läsionsgruppen** in farblich anderer Gestaltung angegeben.

3.1 KLASSIFIKATION DER HERDINTENSITÄTEN ANHAND DER OCT-MORPHOLOGIE: DIE OCT-SCHADENSKLASSEN

Alle Läsionen wurden im Hinblick auf ihr morphologisches Erscheinungsbild und dessen Veränderungen im zeitlichen Verlauf hin untersucht. Die Kategorisierung und die Entwicklung der Klassifikation fanden retrospektiv, im Anschluss an die Photokoagulation statt und wurde ausschließlich anhand der läsionsspezifischen, in der OCT beobachtbaren, retinalen Veränderungen vorgenommen.

Die Läsionen ließen sich in sieben Klassen (Klasse 0- 6) einteilen. Die Läsionsstärken reichten von nicht sichtbar über minimale sichtbare Veränderungen innerhalb einzelner retinaler Schichten bis hin zu stärksten Veränderungen inklusive Netzhautabhebungen. Jede nächsthöhere Klasse beinhaltet die bereits beschriebenen Schäden der vorangegangenen Schadensklasse (II).

OCT- Schadensklasse 0: Diese Schadensklasse umfasst alle Läsionen, die nicht in der OCT nachweisbar waren. In der Abbildung wurde auf die Darstellung verzichtet.

OCT- Schadensklasse 1: Läsionen mit den sanftesten sichtbaren Veränderungen. Hier findet sich eine Reflektivitätszunahme in der äußeren Körnerschicht, sowie Verdickungen bzw. Vorwölbungen im Bereich der Ellipsoiden Zone (EZ). Nach drei Monaten sind noch minimale Veränderungen sichtbar.

OCT- Schadensklasse 2: Bei diesen Läsionen sind die Veränderungen deutlicher. Im Bereich der äußeren und inneren Segmente (OS und IS) der Photorezeptoren kommt es zur herdbreiten Reflektivitätszunahme, welche sich durch die äußere Körnerschicht (ONL) fortsetzt. Die EZ ist intakt, fortlaufend und erkennbar. Im Heilungsverlauf über drei Monate sieht man leichte Veränderungen der retinalen Schichten.

OCT- Schadensklasse 3: Zu den Veränderungen der OS, IS und ONL kommt eine partielle Abdunkelung der inneren plexiformen Schicht (IPL) in Herdbreite hinzu, jedoch mit Aussparung der äußeren plexiformen Schicht (OPL). EZ und Membrana limitans externa (ELM) wölben sich vor, ihre Linienführung ist erhalten und kontinuierlich. Das RPE erscheint ausgedünnt. Nach drei Monaten sind deutliche Veränderungen der Retina erkennbar.

OCT- Schadensklasse 4: Es kommt zu einer kräftigen läsionsbreiten Reflektivitätszunahme der äußeren Körnerschicht und die partielle Verfärbung der inneren plexiformen Schicht gewinnt an Höhe. Das RPE ist angehoben und die Bruch'sche Membran ist erkennbar. EZ und ELM sind unterbrochen und an den der Läsion angrenzenden Bereichen angehoben. Ein Zusammentreffen der EZ und des RPE ist am Läsionsrand zu erkennen. Auch diese Läsionsklasse ist nach drei Monaten leicht auffindbar.

OCT- Schadensklasse 5: Die Veränderungen entsprechen den in Schadensklasse 4 bereits beschriebenen Phänomenen. Begleitet werden die Läsionen von einem ödematösen Halo. Durch die Abhebung wölben sich die neurosensorischen Schichten der Retina aufwärts in Richtung Glaskörper. Zusätzlich findet sich meist eine herdbreite Reflektivitätszunahme in der Ganglienzellschicht (GL). Im Heilungsverlauf zeigen sich nach drei Monaten kräftige Gewebereaktionen.

OCT class	1	2	3	4	5	6
illustration						
OCT examples						
treatment day						
7 days post treatment						
30 days post treatment						
90 days post treatment						
power	43 mW	40 mW	83 mW	40 mW	53 mW	58 mW
duration	23 ms	22 ms	200 ms	200 ms	200 ms	200 ms
temperature	55 °C	57 °C	64 °C	66 °C	68 °C	96 °C
diameter	0	0	167 µm	186 µm	204 µm	238 µm
GLD: day 1	124 µm	136 µm	234 µm	320 µm	397 µm	554 µm
day 7	100 µm	127 µm	229 µm	303 µm	376 µm	394 µm
day 30	82 µm	118 µm	213 µm	269 µm	297 µm	320 µm
day 90	65 µm	96 µm	175 µm	218 µm	247 µm	279 µm

Abbildung 14: Klassifikation anhand der OCT- Morphologie

Die Schadensklassen sind in der obersten Zeile aufgeführt. Die in der zweiten Zeile zur Darstellung kommende Illustration zeigt schematisch die schadensklassenspezifischen Veränderungen der Retina. Zu jeder Schadensklasse ist ein Beispielherd mit seinen Veränderungen im zeitlichen Verlauf aufgeführt. Im unteren Bereich sind als technische Parameter angegeben: Leistung, Bestrahlungsdauer, Temperatur und funduskopischer Durchmesser. Darunter befinden sich die OCT GLD des entsprechenden Herdes.

OCT- Schadensklasse 6: Dies ist die Schadensklasse mit den stärksten Gewebereaktionen, sowohl in der Erstreaktion als auch im Heilungsverlauf. Das Läsionsbild entspricht dem in Klasse 5 detailliert beschriebenen. Überdies kommt es zu einer horizontal verlaufenden, ovalen Reflektivitätsabnahme zwischen den retinalen Schichten, in Höhe der Photorezeptorsegmente. Dies sind die Minimalveränderungen dieser Läsionsstärke, fakultativ waren in dieser Klasse noch stärkere Schäden als die hier beschriebenen sichtbar, wie z.B. Läsionen mit durchgreifenden Veränderungen aller Schichten.

Mit folgenden Anteilen sind die Läsionen in den OCT- Schadensklassen vertreten: Klasse 0 beinhaltet 22 Läsionen, Klasse 1: 41 Läsionen, Klasse 2: 87 Läsionen, Klasse 3: 132 Läsionen, Klasse 4: 168 Läsionen, Klasse 5: 109 Läsionen und Klasse 6 umfasst 57 Läsionen.

3.2 VALIDITÄT DER GEFUNDENEN OCT- SCHADENSKLASSEN

Die Kriterien, welche zur Validierung der OCT- Schadensklassen herangezogen wurden, sind folgende: der Läsionsdurchmesser im Fundusfoto am Tag 1, der Schadensdurchmesser in der OCT zu allen vier Evaluationszeitpunkten, die Laserausgangsleistung und die Herdspitztemperatur während der Photokoagulation. Anhand dieser Parameter wurden die Validität und die Reihenfolge der postulierten OCT- basierten Läsionsklassen statistisch überprüft. Darüber hinaus wurde der Einfluss des behandelten Auges statistisch untersucht.

3.2.1 Läsionsdurchmesser im Fundusfarbfoto und in der OCT

Läsionsdurchmesser im Fundusfarbfoto

Für diese Auswertung wurden alle Herde mit einbezogen, welche in der Funduskopie am Tag 1 etwa 2 Stunden nach der Applikation in den Aufnahmen detektiert wurden. Die OCT- Schadensklasse 1 (7 Läsionen) waren im Fundusfoto nicht sichtbar. OCT- Schadensklasse 2 (49 Läsionen) war zu knapp über 50 % detektierbar. In OCT-Schadensklasse 3 befanden sich 118 Läsionen, in OCT- Schadensklasse 4: 167 Läsionen, in OCT- Schadensklasse 5: 106 Läsionen und OCT- Schadensklasse 6 umfasste 54 Läsionen.

Der mediane funduskopische Durchmesser der OCT- Schadensklasse 1 betrug 0 µm (IQR 0 µm), damit waren Läsionen dieser Klasse überwiegend nicht mit der Funduskopie sichtbar. Für OCT- Schadensklasse 2 betrug der Median 86 µm (IQR 0- 112 µm), OCT- Schadensklasse 3: 120 µm (IQR 102- 151 µm), und im Verlauf weiterhin stetig größer werdend über OCT- Schadensklasse 4 mit 163 µm (IQR 138- 194 µm) und OCT- Schadensklasse 5: 178 µm (IQR 155- 210 µm) bis hin zu OCT- Schadensklasse 6 mit einem Median von 196 µm (IQR 163- 241 µm).

Der Einfluss der OCT- Schadensklasse auf den Läsionsdurchmesser im Fundusfoto war signifikant ($p < 0,001$). In der Post- Hoc- Analyse wurden die Unterschiede der OCT- Schadensklassen 4 gegen 5 und 5 gegen 6 als nicht signifikant befunden, alle anderen Kombinationen der Schadensklassen stellten sich als signifikant zueinander heraus ($p < 0,05$, nach Adjustierung für multiples Testen).

Läsionsdurchmesser in der OCT nach zwei Stunden (GLD-OCT 2h)

In die Auswertung eingeschlossen wurden 606 Läsionen, für die eine OCT- Aufnahme zwei Stunden nach der Applikation vorlag. Die Kategorien traten mit folgenden Häufigkeiten auf: **OCT- Schadensklasse 0**: 22 Läsionen, **OCT- Schadensklasse 1**: 41 Läsionen, **OCT- Schadensklasse 2**: 87 Läsionen, **OCT- Schadensklasse 3**: 132 Läsionen, **OCT- Schadensklasse 4** umfasste 168 Herde und war am häufigsten vertreten. **OCT- Schadensklasse 5** umfasste 109 Läsionen und **OCT- Schadensklasse 6**: 57 Läsionen.

In Bezug auf die Läsionsdurchmesser in der OCT stellte sich das Ergebnis wie folgt dar: **OCT- Schadensklasse 0** vereinigte Läsionen, die nicht in der OCT nachweisbar waren, ihr Durchmesser betrug 0 μm (in der Abbildung nicht aufgeführt). Bei Läsionen der **OCT- Schadensklasse 1** betrug der mediane Durchmesser 148 μm (IQR 129- 189 μm) und entsprach damit annähernd dem Bestrahlungsdurchmesser des Lasers von 133 μm . Die medianen Durchmesser stiegen kontinuierlich an über **OCT- Schadensklasse 2** mit 193 μm (IQR 164- 219 μm), **OCT- Schadensklasse 3**: 239 μm (IQR 203-273 μm), **OCT- Schadensklasse 4**: 279 μm (IQR 249- 316 μm), **OCT- Schadensklasse 5**: 320 μm (IQR 264- 413 μm) und Läsionen der **OCT- Schadensklasse 6** erreichten im Median 426 μm (IQR 273- 486 μm).

Es konnte ein signifikanter Einfluss der **OCT- Schadensklasse** auf den OCT GLD festgestellt werden ($p < 0,001$). In der Post- Hoc- Analyse wurden die Unterschiede von den **OCT- Schadensklassen** 0 gegen 1, 1 gegen 2, 4 gegen 5 und 5 gegen 6 als nicht signifikant befunden, alle anderen Klassenkombinationen stellten sich als signifikant zueinander dar.

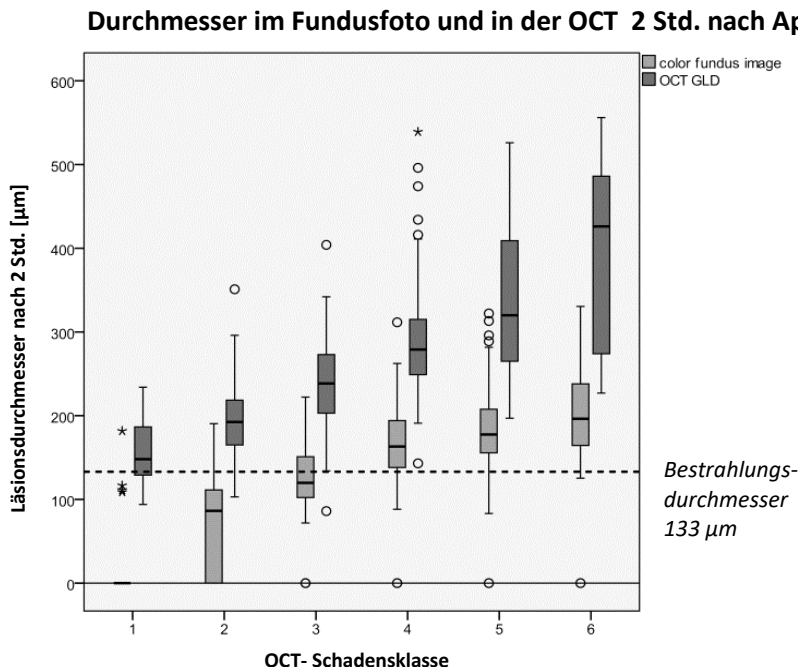


Abbildung 15: Läsionsdurchmesser im Fundusfoto und in der OCT

Die Box- Whisker- Plots stellen den funduskopischen Läsionsdurchmesser in hellgrau und den OCT GLD in dunkelgrau graphisch dar. Über alle Schadensklassen war eine Zunahme des Läsionsdurchmessers mit Ansteigen der Schadensklasse ersichtlich. OCT GLD waren über alle Klassen insgesamt größer als die funduskopischen Durchmesser. OCT- Schadensklasse 1 war funduskopisch überwiegend nicht sichtbar, ließ sich jedoch in der OCT mit einem Durchmesser von 148 μm nachweisen. Dies entsprach annähernd dem Bestrahlungsdurchmesser des Lasers von 133 μm (gestrichelte Linie).

3.2.2 Realleistungen und Spitzenendtemperaturen

Die Graphik in Abb. 16 bezieht sich nur auf Läsionen mit einer gleichen und festen Expositionszeit von 200 ms. Die Festsetzung einer Variable (hier: die Bestrahlungszeit) war notwendig, um einen direkten Vergleich der Leistungen bzw. Spitzenendtemperaturen vornehmen zu können.

Unter Anwendung dieser 200 ms- Expositionszeit entstanden keine sanfteren Läsionen als **OCT- Schadensklasse 2**, Läsionen der **OCT- Schadensklasse 0** und **1** wurden im gewählten Leistungsbereich mit dieser Einstellung nicht erzeugt. Ansteigende **OCT- Schadensklassen** korrelierten mit einem Anstieg der Spitzenendtemperatur und der Leistung.

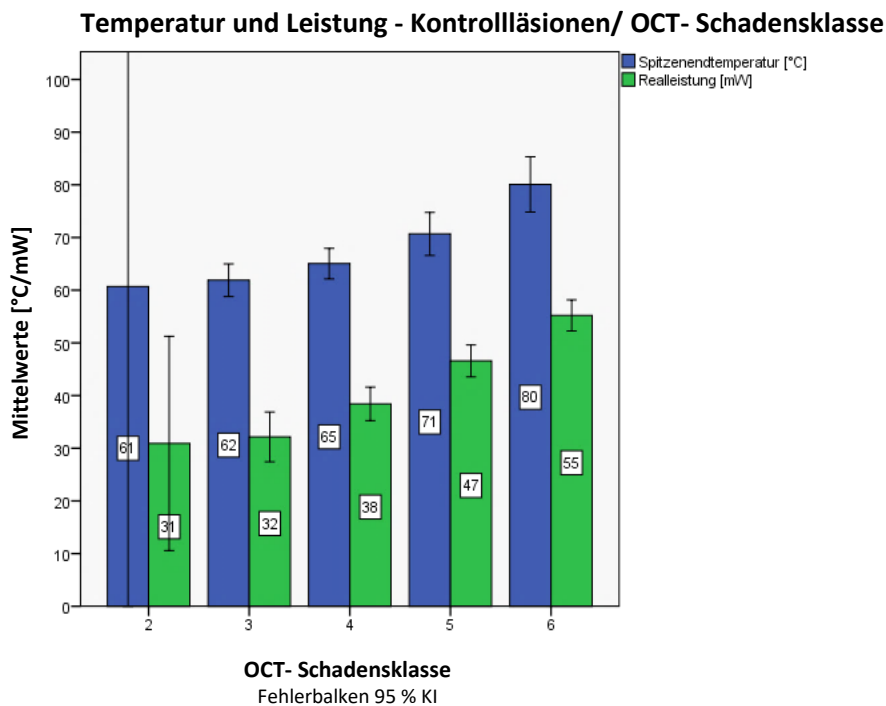


Abbildung 16: Realleistung und Spitzenendtemperatur

Balkendiagramm zur Darstellung der Leistung (grün) in [mW] und der Temperatur (blau) in [°C] in Bezug auf die jeweilige OCT- Schadensklasse. Eingeschlossen in die Berechnung wurden ausschließlich Läsionen mit einer festen Expositionszeit von 200 ms. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte. In OCT- Schadensklasse 2 waren nur zwei gültige Werte vorhanden, was die Größe des Fehlerbalkens erklärt. Die graphische Darstellung zeigt die Zunahme von Spitzenendtemperaturen und Realleistungen mit Ansteigen der Schadensklasse. Die Leistung stieg von 30,9 mW bis auf 55,2 mW; die Temperatur von 61 °C auf 80 °C.

Leistungen der OCT- Schadenklassen

Die Variablen konnten parametrisch ausgewertet werden, die Angabe erfolgt in Mittelwerten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist auch für **OCT- Schadensklasse 2** ein - mathematisch nicht korrekter - Fehlerbalken gezeigt, da nur zwei gültige Herde zur Wertung vorlagen. Die mittlere Leistung von **OCT- Schadensklasse 2** betrug 30,9 mW, von **OCT- Schadensklasse 3**: 32,1 mW, weiter ansteigend über **OCT- Schadensklasse 4**: 38,3 mW, **OCT- Schadensklasse 5**: 46,6 mW zu **OCT- Schadensklasse 6** mit 55,2 mW.

Der Einfluss der Leistung auf die **OCT- Schadensklasse** erwies sich als signifikant ($p < 0,001$). In der Post- Hoc- Analyse stellten sich der Unterschied der **OCT- Schadensklassen** 3 gegen 5 und 6, **OCT- Schadensklasse** 4 gegen 5 und 6, sowie **OCT- Schadensklasse** 5 gegen 6 als signifikant heraus.

Temperaturen der OCT- Schadensklassen

Mit dem Anstieg der **OCT- Schadensklasse** ist ein Ansteigen der Herdspitzentemperatur ersichtlich. Mittelwerte der Spitzenendtemperaturen waren folgende: **OCT- Schadensklasse** 2: 61 °C, **OCT- Schadensklasse** 3: 62 °C, **OCT- Schadensklasse** 4: 65 °C, **OCT- Schadensklasse** 5: 71 °C und **OCT- Schadensklasse** 6: 80 °C.

Der Einfluss der **OCT- Schadensklasse** auf die Spitzenendtemperatur war signifikant ($p < 0,001$). In der Post- Hoc- Analyse stellten sich nur die **OCT- Schadensklassen** 6 gegen 3, 4 und 5 als signifikant unterschiedlich heraus.

3.2.3 Heilungsverlauf über drei Monate

Die Beurteilung des Heilungsverlaufes fand über drei Monate statt und ist in Abb. 17 dargestellt. Mit Ansteigen der **OCT- Schadensklasse** war eine Zunahme des Läsionsdurchmessers verbunden. Während des Heilungsverlaufes kam es zu jedem

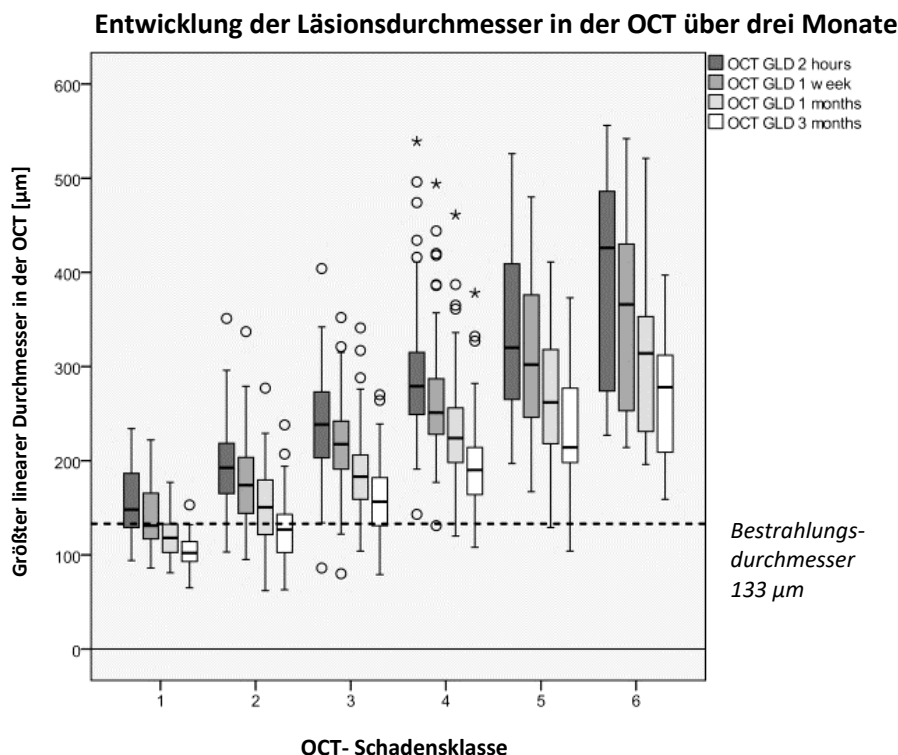


Abbildung 17: Heilungsverlauf der Läsionen aller OCT- Klassen über drei Monate

In vier Grautönen kommen die OCT GLD der vier verschiedenen Messzeitpunkte zur Darstellung. Aufgestellt wird die jeweilige OCT- Schadensklasse in Bezug zum Durchmesser in µm. Sichtbar wird, dass mit Ansteigen der OCT- Schadensklasse eine Zunahme der Läsionsdurchmesser insgesamt zu verzeichnen war. Ebenso kam es im Heilungsverlauf zur Reduktion des Durchmessers innerhalb einer Klasse, wobei die Zunahme der Läsionsgröße über alle Schadensklassen erhalten blieb.

Evaluationszeitpunkt zu einer Verkleinerung der Läsionsdurchmesser, wobei die Größenzunahme über die Klassen erhalten blieb.

Die Läsionen der einzelnen OCT- Schadensklassen zeigten dem nach dreimonatigem Heilungsverlauf folgende Durchmesser: OCT- Schadensklasse 1 im Median betrug der Durchmesser 102 μm (IQR 90- 116 μm), OCT- Schadensklasse 2: 127 μm (IQR 102- 143 μm), OCT- Schadensklasse 3: 157 μm (IQR 131- 182 μm), OCT- Schadensklasse 4: 190 μm (IQR 164- 214 μm), sowie OCT- Schadensklasse 5: 214 μm (IQR 197- 278 μm) und OCT- Schadensklasse 6 mit einem Median von 278 μm (IQR 209- 314 μm).

3.2.4 Einfluss des individuellen Auges

Alle sechs Kaninchenaugen dieser Studie wurden mit unterschiedlichen Laserleistungen behandelt, welche sich an der individuellen Schwelle für die Läsionssichtbarkeit orientierten. Für die beobachteten Parameter Leistung, Spitzenendtemperatur, Läsionsdurchmesser im Fundusbild und Läsionsdurchmesser in der OCT fanden wir in einer globalen Analyse die bisher gezeigten p- Werte. Die dargestellten Zusammenhänge wurden nochmals für jedes Auge separat berechnet. Die Signifikanzen waren schwächer, doch gut vereinbar mit den Ergebnissen der globalen Auswertung.

3.2.5 Gegenüberstellung: Validitätskriterien OCT- Schadensklassen

Diese Tabelle ist eine zusammenfassende Gegenüberstellung der beschriebenen Validitätskriterien. Sie zeigt für jede OCT- Schadensklasse den Anteil der funduskopisch sichtbaren Läsionen, die Läsionsdurchmesser im Fundusfoto nach 2 Stunden und den OCT GLD nach 2 Stunden und nach 3 Monaten, sowie die Laserleistung und Temperaturen.

OCT- LÄSIONSKLASSE		Sichtbarkeit Fundusfoto nach 2 h	Ø Fundus nach 2 h	Ø OCT nach 2 h	Ø OCT nach 3 Mon	Leistung 200ms - Läsionen	Temperatur 200ms - Läsionen
		[%]	Median, [μm]			MW, [mW]	MW, [$^{\circ}\text{C}$]
	0	0	-	-	-	-	-
	1	17	0	148	102	-	-
	2	56	86	193	127	31	61
	3	89	120	239	157	32	62
	4	98	163	279	190	38	65
	5	97	178	320	214	47	71
	6	95	196	426	278	55	80

Abbildung 18: Validitätskriterien in Abhängigkeit zur OCT- Schadensklasse

Für jede OCT- Schadensklasse findet sich in dieser Tabelle zum einen die prozentuale Angabe der funduskopischen Sichtbarkeit zwei Stunden nach Applikation der Laserherde und zum anderen die Angabe der Läsionsdurchmesser in μm , gemessen im Fundusfarbfoto nach zwei Stunden, sowie in den OCT- Bildern nach zwei Stunden und drei Monate nach der Applikation. Des Weiteren sind Temperatur- und Leistungsangaben aufgeführt, diese beziehen sich jedoch nur auf die Kontrollläsionen mit einem festen Bestrahlungszeitfenster von 200 ms.

3.3 TIME- TEMPERATURE- CHARACTERISTIC- LESIONS (TTC)

Bei den **TTC- Läsionen** = ‚Time-Temperature-Characteristic-Lesion‘ wurde die temperaturkontrollierte automatische Abschaltung des Lasers genutzt, so dass die Expositionszeit herdividuell auf die jeweilige Sollstärke geregelt wurde. Die Intensitätsauswahl erfolgte vor der Photokoagulation, also prospektiv. Insgesamt gab es fünf verschiedene Läsionsstärken, die Spannweite der Intensität sollte von funduskopisch unsichtbar bis eindeutig überschwellig reichen (IV). Die schwächsten Läsionen sollten in **TTC- Läsionsgruppe** 1 erzeugt werden, von ansteigender Intensität bis zu **TTC- Läsionsgruppe** 5, entsprechend einer vertikalen Verschiebung der Arrheniuskurve (siehe Abb. 2).

Es gab 797 **TTC- Läsionen**, sie verteilten sich wie folgt auf die Gruppen (Laserleistung): **TTC- Läsionsgruppe** 1 mit 119 Läsionen (20- 50,1 mW), **TTC- Läsionsgruppe** 2: 141 Läsionen (20- 58,1 mW), **TTC- Läsionsgruppe** 3: 223 Läsionen (20- 65,2 mW), **TTC- Läsionsgruppe** 4: 190 Läsionen (25- 56,5 mW) und 124 Läsionen in **TTC- Läsionsgruppe** 5 (27,5- 66,4 mW).

3.3.1 Funduskopische Sichtbarkeit und Nachweise in der OCT

Es besteht eine Differenz zwischen funduskopischer Sichtbarkeit und Detektierbarkeit in der OCT bei den sanften Läsionsgruppen. **TTC- Läsionsgruppe** 1 und 2 waren zu 17 bzw. 38 % funduskopisch sichtbar, in der OCT jedoch zu 68 bzw. 90 % nachweisbar (vergl. Abb. 19). Ab **TTC- Läsionsgruppe** 3 waren die Läsionen zu 94- 97% im Fundusfarbfoto und in der OCT mit 98- 100 % nachweisbar.

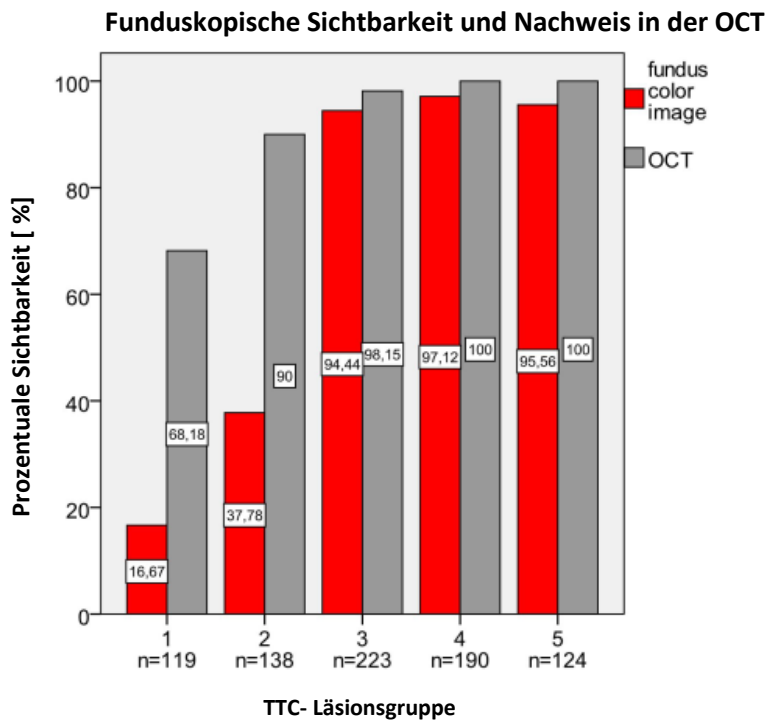


Abbildung 19: Sichtbarkeit im Fundusfoto und in der OCT zwei Stunden nach der Applikation

Prozentuale Darstellung der Sichtbarkeiten von TTC- Läsionen im Fundusfoto (rot) und in der OCT (grau), zwei Stunden nach Applikation, eingeschlossen 794 Läsionen. TTC- Läsionsgruppe 1 und 2 funduskopisch nur in 17 bzw. 38 % sichtbar, während sie in der OCT zu 68 bzw. 90 % detektierbar waren. Ab TTC- Läsionsgruppe 3, 4 und 5 waren die Läsionen mit 94- 97 % im Fundusfoto und mit 98- 100 % sicher in der OCT detektierbar.

Der Einfluss der **TTC- Läsionsgruppen** war für beide Parameter signifikant, sowohl im Hinblick auf die Ergebnisse aus der funduskopischen Messung, als auch auf die Messung in der OCT (Fisher's- Exact- Test, $p < 0,001$).

3.3.2 Läsionsdurchmesser im Fundusfarbfoto und in der OCT

In diese Bewertung wurden insgesamt 479 Läsionen eingeschlossen. Die in der OCT erfassten Durchmesser waren für alle Läsionen größer als die funduskopisch erfassten. Mit Ansteigen der **TTC- Läsionsgruppe** kam es sowohl funduskopisch als auch in der OCT zur Zunahme des Läsionsdurchmessers. Im Heilungsverlauf kam es zu einer Reduktion der Läsionsdurchmesser, über die **TTC- Läsionsgruppen** blieb die Zunahme der Durchmesser erhalten. Zum Endzeitpunkt unserer Beobachtungen waren weiterhin Läsionen der **TTC- Läsionsgruppe** 4 und 5 die Schäden mit den größten Durchmessern, während Läsionen der **TTC- Läsionsgruppe** 1 und 2 die Schäden mit dem geringsten Durchmesser darstellten. Läsionen der **TTC- Läsionsgruppe** 3 zeigten im Fundusfoto zwei Stunden nach der Applikation und in der OCT drei Monate nach der Applikation einen Durchmesser, welcher annähernd dem Bestrahlungsdurchmesser entsprach (vergl. Abb. 20 und Abb. 21).

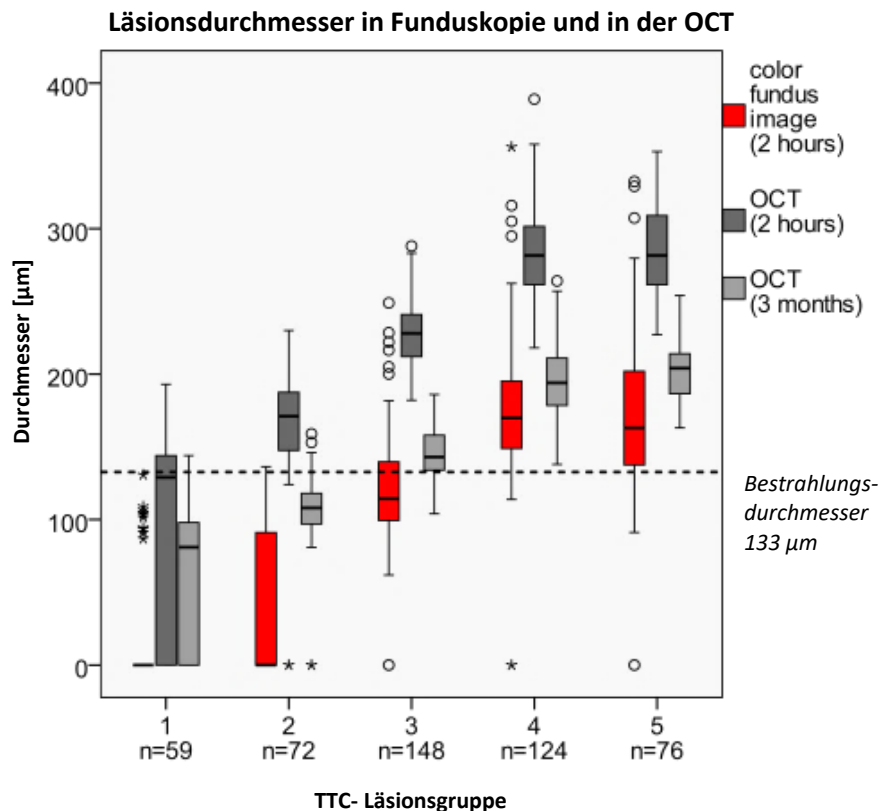


Abbildung 20: Funduskopische Durchmesser und OCT GLD der TTC- Läsionsgruppen

Box- Plot über die Durchmesser in μm im Fundusfoto (rot) und in der OCT nach 2 Stunden (dunkelgrau) und in der OCT nach 3 Monaten (hellgrau). Die gepunktete Linie gibt den Durchmesser des Bestrahlungslasers an. Die OCT GLD stellten sich insgesamt größer dar als die funduskopischen Durchmesser. Mit Ansteigen der TTC- Läsionsgruppe kam es zur Zunahme des Läsionsdurchmessers, ebenso verhielt es sich im Heilungsverlauf. Zwischen TTC- Läsionsgruppe 4 und 5 zeigte sich keine signifikante Größenzunahme mehr. Der funduskopische Durchmesser und der OCT GLD nach 3 Monaten von TTC- Läsionsgruppe 3 entsprach annähernd dem Bestrahlungsdurchmesser des Lasers.

Zwei Stunden nach Applikation wurden folgende mediane Durchmesser in der Funduskopie erfasst: Die Mediane der **TTC- Läsionsgruppe** 1 und 2 betrugen 0 µm (TTC 1: IQR 0- 0 µm, TTC 2: IQR 0- 93 µm). **TTC- Läsionsgruppe** 3: 114 µm (IQR 99- 140 µm), **TTC- Läsionsgruppe** 4: 170 µm (IQR 149- 195 µm) und **TTC- Läsionsgruppe** 5 betrug 163 µm (IQR 137- 202 µm).

Die Mediane der OCT- GLD 2h stellten sich wie folgt dar: **TTC- Läsionsgruppe** 1 maß 129 µm (IQR 0- 144 µm), **TTC- Läsionsgruppe** 2: 171 µm (IQR 147- 188 µm), **TTC- Läsionsgruppe** 3: 228 µm (IQR 212- 241 µm), **TTC- Läsionsgruppe** 4: 282 µm (IQR 261- 302 µm) und der Median der **TTC- Läsionsgruppe** 5 betrug 282 µm (IQR 260- 309 µm). Zwischen **TTC- Läsionsgruppe** 4 und 5 war keine signifikante Größenzunahme mehr zu verzeichnen.

Im Heilungsverlauf über drei Monate wurden folgende medianen Läsionsdurchmesser erfasst: **TTC- Läsionsgruppe** 1 maß 81 µm (IQR 0- 98 µm), **TTC- Läsionsgruppe** 2: 108 µm (IQR 97- 118 µm), **TTC- Läsionsgruppe** 3: 143 µm (IQR 134- 158 µm), **TTC- Läsionsgruppe** 4: 194 µm (IQR 178- 211 µm) und **TTC- Läsionsgruppe** 5 betrug 204 µm (IQR 186- 214 µm).

Es wurden signifikante Differenzen in Bezug auf den Durchmesser im Fundusfarbfoto, dem GLD- OCT nach zwei Stunden und GLD- OCT nach drei Monaten in den fünf **TTC- Läsionsgruppen** festgestellt (Kruskal- Wallis- Test, $p < 0,001$). Bei einem Post- Hoc- Vergleich der paarweisen Differenzen stellten sich alle Paare für alle drei Parameter als signifikant verschieden heraus (Wilcoxon- Rangsummen- Test, $p < 0,001$), Ausnahme bildete der Vergleich von TTC- Läsionsgruppen 4 und 5 ($p = 1$).

3.3.3 Gegenüberstellung: Validitätskriterien TTC- Läsionsgruppen

Diese Tabelle in Abb. 21 ist eine zusammenfassende Gegenüberstellung der beschriebenen Validitätskriterien. Sie zeigt für jede **TTC- Läsionsgruppe** die numerische Verteilung über die Gruppen, die Durchmesser im Fundusfoto nach 2 Stunden und den größten linearen Durchmesser in der OCT nach 2 Stunden und im Heilungsverlauf nach 3 Monaten.

		Anzahl	Ø Fundus nach 2 Std.		GLD OCT nach 2 Std.		GLD OCT nach 3 Mon.	
		n	Median [µm] (IQR)	P -Werte Paarweiser Vergleich	Median [µm] (IQR)	P -Werte Paarweiser Vergleich	Median [µm] (IQR)	P -Werte Paarweiser Vergleich
TTC- LÄSIONSGRUPPE	1	59	0 (0-0)		129 (0-144)		81 (0-98)	
	2	72	0 (0-93)	1 vs. 2 < 0,001	171 (147-188)	1 vs. 2 < 0,001	108 (97-118)	1 vs. 2 < 0,001
	3	148	114 (99-140)	2 vs. 3 < 0,001	228 (212-241)	2 vs. 3 < 0,001	143 (134-158)	2 vs. 3 < 0,001
	4	124	170 (149-195)	3 vs. 4 < 0,001	282 (261-302)	3 vs. 4 < 0,001	194 (178-211)	3 vs. 4 < 0,001
	5	76	163 (137-202)	4 vs. 5 1	282 (260-309)	4 vs. 5 1	204 (186-214)	4 vs. 5 1
P			< 0,001		< 0,001		< 0,001	

Abbildungung 21: Validitätskriterien in Bezug zur TTC- Läsionsgruppe

Die Tabelle zeigt neben den numerischen Anteilen der TTC- Läsionsgruppen die medianen funduskopischen Durchmesser nach 2 Std., die OCT GLD nach 2 Stunden und nach 3 Monaten. In Klammern ist der Interquartile Range aufgeführt. Darüber hinaus kommen die p- Werte der statistischen Auswertung zur Darstellung: Zum einen der Bezug der TTC- Läsionsgruppen zu den drei Parametern (p unten, Kruskal- Wallis- Test), zum anderen der paarweise Vergleich einzelner TTC- Läsionsgruppen zueinander (Wilcoxon- Rangsummen- Test).

3.4 BEWERTUNG DER TTC- LÄSIONSGRUPPEN ANHAND DER ERZEUGTEN OCT- SCHADENSKLASSEN

Temperatur- Zeit- kontrollierte Läsionen zeigten innerhalb der jeweiligen Gruppe homogene Ergebnisse bezüglich ihres Ausprägungsgrades. Diese Homogenität war unabhängig der angewandten Laserausgangsleistungen zu beobachten, siehe Abb. 7. Anhand des funduskopischen Eindrucks konnte bereits eine qualitative Einschätzung vorgenommen werden bezüglich der Effektstärke. Läsionen der **TTC- Läsionsgruppe 2** erschienen sanfter als Läsionen der **TTC- Läsionsgruppe 5**.

Zur Bewertung der Herdintensitäten der einzelnen **TTC- Läsionsgruppen** wurde das eigenständig entwickelte und in Kapitel 3.1 und 3.2 ausführlich vorgestellte Klassifikationssystem angewandt. Die **OCT- Schadensklassen** wurden auf die **TTC- Läsionsgruppen** übertragen, die Darstellung ihrer relativen Verteilung erfolgt als Balkendiagramm. Diese Bewertung ermöglicht zeitgleich eine Aussage bezüglich der Läsionsintensität und einen Rückschluss auf das morphologische Erscheinungsbild (IV).

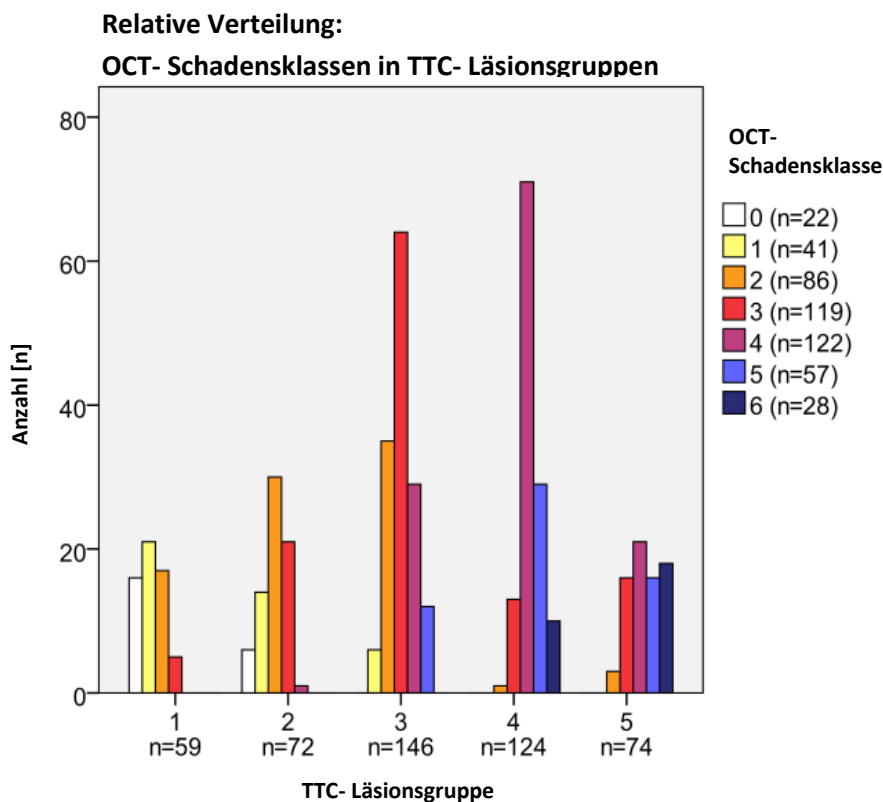


Abbildung 22: Relative Verteilung der OCT- morphologischen Schadensklassen in Bezug zu den TTC- Läsionsgruppen

475 Läsionen wurden in diese Evaluation eingeschlossen. Die einzelnen OCT- Schadensklassen wurden farblich kodiert (in ansteigender Intensität von weiß über rot zu blau) und ihre relative Verteilung in den TTC- Läsionsgruppe als Balkendiagramme dargestellt. Es zeigt sich, dass sich die morphologisch sanfteren Läsionsklassen in den niedrigeren TTC- Läsionsgruppen widerspiegeln. In den höheren TTC- Läsionsgruppen befinden sich die stärkeren, intensiveren Läsionen, wie sie in den OCT- morphologischen Klassifikation anhand ihres morphologischen Erscheinungsbildes definiert wurden. In den TTC- Läsionsgruppen 1 und 2 befinden sich hauptsächlich Läsionen, welche überwiegend funduskopisch nicht sichtbar bzw. nur zu einem geringen Anteil sichtbar waren. Ihre Nachweisbarkeit gelang erst in der OCT zu einem höheren Prozentsatz.

Mit **TTC- Läsionsgruppe** 1 wurden etwa gleichhäufig Läsionen der **OCT- Schadensklasse** 0, 1 und 2 erzeugt, im geringeren Umfang noch **OCT- Schadensklasse** 3. Diese **TTC- Läsionsgruppe** 1 zeigte einen relativ großen Anteil von Läsionen der **OCT- Schadensklasse** 0 und 1, welche überwiegend funduskopisch unsichtbar sind. Die funduskopische Sichtbarkeit der OCT- Schadensklasse 2 betrug 56 % (ohne Abbildung). **TTC- Läsionsgruppe** 2 umfasste überwiegend **OCT- Schadensklasse** 2 und zu geringeren Anteilen **OCT- Klasse** 3 und 1. **TTC- Läsionsgruppe** 3 bestand größtenteils aus **OCT- Schadensklasse** 3, mit geringeren Anteilen von **OCT- Schadensklasse** 2 und 4. Ebenso verhält es sich mit **TTC- Läsionsgruppe** 4, sie bestand zum Großteil aus **OCT- Schadensklasse** 4, mit geringeren Anteilen von **OCT- Schadensklasse** 5 und 3. Die höchste Variabilität war in der **TTC- Läsionsgruppe** 5 zu vermerken, hier traten zu annähernd gleichen Anteilen die **OCT- Schadensklassen** 3, 4, 5 und 6 auf.

Die statistische Überprüfung erfolgte mit dem Fisher's- Exact- Test. Die Verteilung der **OCT- Schadensklassen** unterschied sich signifikant zwischen den **TTC- Läsionsgruppen**.

4. DISKUSSION

Diese Studie beinhaltet eine vergleichende Analyse von 1022 Photokoagulationsläsionen. Zur Anwendung kam ein Photokoagulationslaser im grünen Farbspektrum (532 nm), der Bestrahlungsdurchmesser betrug 133 µm. Die Bestrahlungsleistungen und -dauer waren variabel (20- 66,4 mW, 7- max. 800 ms). Appliziert wurden 225 Kontrollläsionen mit einer festen Bestrahlungsdauer von 200 ms und 797 Läsionen (-3: Kalibrierungsfehler) unter Anwendung der automatischen temperaturkontrollierten Abschaltung.

Zur Beurteilung der Läsionen wurden die Parameter funduskopische Sichtbarkeit, funduskopischer Durchmesser, Durchmesser in der OCT (OCT GLD) und Temperatur zum Bestrahlungsendzeitpunkt auf Höhe des RPE genutzt. Zu vier festen Beobachtungszeitpunkten (2 Std., 1 Woche, 1 und 3 Monate nach Applikation) erfolgten erneute Bildgebungen und die Evaluation des Heilungsverlaufes. Anhand der Morphologie im OCT-Bild nach 2 Stunden entstand eine fein graduierte, siebenstufige Klassifikation der Läsionen (OCT- Schadensklasse 0- 6). Die Schadensklassen stellten sich bezüglich der genannten Parameter von ansteigender Intensität dar. Eine überwiegende funduskopische Sichtbarkeit bestand ab OCT- Schadensklasse 2, in der OCT jedoch waren OCT- Schadensklassen 0 und 1 zu höheren Anteilen detektierbar.

Ziel dieser Studie war es, fünf verschieden starke Time-Temperature-Characteristic-Läsionsgruppen mit der automatischen Abschaltung zu erzeugen. Die Spannweite der Läsionsintensitäten sollte von funduskopisch unsichtbar bis eindeutig überschwellig reichen, um sowohl den unterschwelligen als auch dem üblichen therapeutischen Bereich zu entsprechen. Dieses Zielkriterium wurde anhand des selbst entwickelten OCT-morphologischen Klassifikationssystems bewertet, zur weiteren Überprüfung wurden zusätzlich die Parameter funduskopische Sichtbarkeit, funduskopischer Durchmesser und Durchmesser in der OCT herangezogen.

Jede TTC- Läsionsgruppe zeigte ein homogenes Erscheinungsbild und war reproduzierbar, auch im subvisible Bereich. Läsionen der TTC- Läsionsgruppe 1 und 2 waren in der OCT zu 68 bzw. 90 % detektierbar, bei einer funduskopischen Sichtbarkeit von nur 17 bzw. 38 %. Bei Anwendung der OCT- Schadensklassen zur Bewertung der TTC- Läsionsgruppen ergab dies eine Verteilung der sanften OCT- Schadensklassen in niedrigere TTC- Läsionsgruppen und der kräftigeren OCT- Schadensklassen auf höhere TTC- Läsionsgruppen.

4.1 BESCHREIBEN VON PHOTOKOAGULATIONS-LÄSIONEN

Gebräuchlich ist eine Bestimmung der Läsionsintensität anhand der retinalen Weißfärbung in der Funduskopie direkt im Anschluss nach der Applikation. Es wird in drei bis vier Klassen unterteilt, etwa in „leichte“, „deutliche“ und „starke Hellfärbung“ (Framme et al., 2008). Andere Begrifflichkeiten sind „barely visible“, „light“ und „moderate“ (Palanker et al., 2011).

Diese gebräuchlichen Beschreibungen sind von der subjektiven Einschätzung des Behandlers und vom Beobachtungszeitpunkt abhängig. Sie unterliegen einem gewissen Mangel an Objektivität und Reliabilität. Bei Interpretation der Fundusfarbfotographien ist zu bedenken, dass der Aufnahmezeitpunkt in dieser Studie zwei Stunden nach Applikation der Herde liegt. Es darf davon ausgegangen werden, dass die Sichtbarkeit bzw. Weißfärbung der Läsionen unmittelbar im Anschluss der Applikation, welche dem Behandler unter klinischen Bedingungen (Standard: Auswertung 3 Sekunden nach Applikation) als direktes Kriterium zur Dosierung der Laserleistung dient, geringer ausfällt als die im Fundusfarbfoto nach 2 Stunden abgebildete Weißfärbung (Weinberg et al., 1981).

Limitiert wird die Beschreibung durch die Grenze der Wahrnehmung des menschlichen Auges. Im Falle unterschwelliger Läsionen, im Sinne von funduskopisch unsichtbaren Läsionen, ist es mit diesem Einschätzungsverfahren nicht möglich zu bestimmen, ob diese Läsion einen biologischen Effekt erzielt hat und falls ja, in welchem Ausmaß (Koinzer et al., 2012). Es bedarf der Unterstützung anderer Messverfahren, um den entstandenen Schaden einschätzen zu können.

In dieser Studie wurde eine siebenstufige OCT- morphologische Klassifikation (Klasse 0- 6) vorgestellt (II), welche im Anschluss anhand der Koagulationsergebnisse erstellt wurde. Mit diesen bildmorphologischen Definitionen der **OCT- Schadensklassen** ist es möglich, die Intensität von Läsionen objektiv zu graduieren, z.B. auch zur Beschreibung der **TTC- Läsionsgruppen**, und dabei auch sanfte Läsionen objektiv zu erfassen, welche mindestens teilweise funduskopisch unsichtbar bleiben. Die vorgestellte OCT- morphologische Läsionsklassifikation dient also einerseits der Objektivierung der Intensitätsbeschreibung von Photokoagulationsläsionen, andererseits verbessert sie die Sensitivität der Schadenserfassung insbesondere im Bereich funduskopisch unterschwelliger Läsionen (II).

4.2 ECHTZEIT- DOSIMETRIE VON PHOTOKOAGULATIONSLASERN

Die optimale Laserdosierung sollte, unabhängig von dem Behandler und von den anatomischen Eigenschaften des zu behandelnden Auges, gleichförmige Läsionen erzeugen. Sie sollte reproduzierbare, konstante Ergebnisse liefern und sicher in der Anwendung sein. Damit könnten Über- und Unterdosierungen vermieden und Nebenwirkungen verhindert werden. Ideal wäre ein Verfahren, welches ein ortsadaptiertes prospektives Effektmonitoring während des Koagulationsvorganges ermöglicht - eine Echtzeit- Dosimetrie ist gewünscht. Die Notwendigkeit hierfür wurde bereits in den 1980er Jahren erkannt, konnte aber nicht effektiv umgesetzt werden und erhielt bis dato keinen Einzug in den klinischen Alltag.

4.2.1 Ansätze zur Lösung des Dosisproblems

Die Erfassung des Schadensausmaßes während der Bestrahlung wurde seit langem angestrebt. Dieses zu erreichen, wurde über das Prinzip der Reflektometrie versucht, bei der die Lichtreflektion im bestrahlten Netzhautareal gemessen wurde. Man nahm an, dass am koagulierten Augenhintergrund mehr Licht reflektiert wird als am unkoagulierten

Fundus, aufgrund der im Rahmen der Koagulation einsetzenden weißlichen Verfärbung bzw. Eintrübung der im Ursprungszustand transparenten Netzhaut. In Abhängigkeit dieses Signalanstieges sollte die Abschaltung erfolgen.

Das Prinzip entwickelte die Arbeitsgruppe um Birngruber (Birngruber et al., 1977 b; Weinberg et al., 1982). Initial kam zur Messung ein Photometer zum Einsatz. Man erkannte, dass die Reflektion und konsekutiv die Absorption nicht nur von der Wellenlänge und dem bestrahlten Areal abhängig sind, sondern auch der Einstrahlwinkel entscheidend ist. Die Messung der Absorption erfolgt am optimalsten aus der Position des koagulierenden Lasers (Pomerantzeff et al., 1983). Alternativ wurde von dieser Arbeitsgruppe versucht, vor Applikationsbeginn durch Erfassen des Pigmentierungsgrades, die zu erwartende Energieabsorption zu ermitteln. Eine Weiterentwicklung bedeutete der Einsatz eines videogestützten Systems, um den Koagulationsfortschritt zu überwachen und eine kontrollierte Koagulation durch ein Rückkopplungssystem zu ermöglichen (Jerath et al., 1993). Die Forschungen begannen am Kaninchen und wurden im Verlauf auf den Patienten übertragen (Inderfurth et al., 1995). Die Methode scheiterte, da sie sehr bewegungs-empfindlich war, zusätzlich wirkten sich die damals relativ langen Expositionszeiten negativ aus. Darüber hinaus zeigten bereits damalige Untersuchungen, dass die Weißfärbung mit einer gewissen Verzögerung nach der Bestrahlung einsetzen (Weinberg et al., 1981), was unsere Arbeitsgruppe in späteren Experimenten mit Echtzeit- OCT- Messungen bestätigen konnte (nicht publiziert). Morphologische Gewebeveränderungen scheinen grundsätzlich zum Effektmonitoring der Photokoagulation in Echtzeit eher ungeeignet zu sein.

Da sich die Lichtreflexion als Parameter zur Effektsteuerung des fortschreitenden Koagulationsschadens als ungeeignet erwies, lag es nahe, den laserinduzierten Temperaturanstieg im Gewebe zum Monitoring zu nutzen. Die Grundlage der biologischen Interaktion von Laserlicht und Gewebe ist im betrachteten Zeitfenster mit Bestrahlungsdauern von unter 1 Sekunde der lichtinduzierte Temperaturanstieg im Gewebe. Es liegt auf der Hand, dass bei fortgesetzter Einwirkung des Lasers der Gewebeschaden mit Zunahme der Bestrahlungsdauer wie auch der Temperatur ansteigt.

Seit längerer Zeit konnte durch Einbringen von Thermosonden Temperaturmessungen an der Netzhaut durchgeführt werden. Dieses invasive Verfahren war nur im Tierversuch oder am Explantat durchführbar. Das Einbringen war trotz Mikromanipulator relativ ungenau, aufgrund der geringen Größe der relevanten Zellstrukturen und des Bestrahlungsareales. Fehlerquellen waren neben der Dislokation, Veränderungen des Zielgewebes durch die Sonde selber (Birngruber, 1991; Parver et al., 1982).

Die Arbeitsgruppe Denton et al. arbeitete mit Zellkulturen, analysierte videogestützt an Infrarotbildern Temperaturentwicklung und -verlauf während der Lichtexposition und setzte sie in Verbindung zum entstehenden Schaden. Damit wurde die Temperaturschwelle zur Schädigung des RPE auf etwa 54 °C bestimmt und es wurde die Position der Spitzentemperatur in der Läsionsmitte bestätigt (Denton et al., 2011). Eine Anwendung in vivo ist aus technischen Gründen bedingt durch den Versuchsaufbau nicht möglich.

Die Arbeitsgruppe um Sramek hat die Temperaturgrenze zur Ruptur humaner Retina auf ca. 180°C berechnen können (Sramek et al., 2009). Es handelt sich um eine theoretische thermische Modellierung nach Arrhenius und der Wärmeleitungsgleichung mit experimenteller Überprüfung einiger Grundlagenparameter an Gewebeexplantaten. Dies ermöglicht für eine Kohorte zuverlässige Angaben, ist aber nicht tauglich zum Monitoring von Einzelläsionen. Aspekte wie der örtliche Pigmentierungsgrad des Zielareales wurden außer Acht gelassen, wenngleich Pigmentierungsschwankungen am Fundus im Allgemeinen nicht nur berücksichtigt, sondern auch experimentell quantifiziert wurden.

Maswadi et al. arbeiteten mit einem magnetresonanztomographisch gestützten Messverfahren an einem Augenmodell mit bovinen RPE- Melanosomen. Temperaturänderungen führen zu Veränderungen der Kernspinresonanz der Protonen, die durch das MRT erfasst werden. Die Detektion von Temperaturänderungen von $\leq 1^\circ\text{C}$ war möglich, die erfassten Werte entsprachen annähernd den Prognosen der klassischen Wärmeleitungsgleichung. Es wurde eine zwei- und dreidimensionale Kartographierung der Temperaturverteilung erstellt. Entscheidender Nachteil ist der hohe zeitliche Aufwand zur Berechnung: eine Schichtdarstellung benötigt 22,9 Sekunden Rechenzeit (Maswadi et al., 2004), was im Vergleich zur einer zig Millisekunden dauernden Photokoagulationsbestrahlung zu lange ist. Ferner wäre die Anwendung eines Netzhautlasers innerhalb einer MRT- Spule wenig praktikabel.

Nachdem die vorgestellten Methoden sich in vivo als nicht anwendbar erwiesen, stellte sich die Frage nach einer alternativen Methode, die Temperatur an der Netzhaut unter Laserbestrahlung zu verfolgen. Eine zukunftssträchtige Möglichkeit zur retinalen Temperaturerfassung während der Photokoagulation nutzt die Modulation optoakustischer Signale bedingt durch die laserinduzierte Gewebeerwärmung. Dieses optoakustische Messverfahren ist nicht invasiv und in Echtzeit durchführbar.

Die optoakustische Temperaturmessung an der Retina wurde zunächst für die Transpupilläre Thermotherapie (TTT) entwickelt. In der TTT wird mittels eines Infrarotlasers (810nm) die Netzhaut großflächig mit 2 mm Bestahlungsdurchmesser erwärmt, mit vergleichsweise langen Expositionszeiten von bis zu 60 Sekunden Dauer. In diesem Zeitfenster ist von photochemischen und weniger von photothermischen Gewebeinteraktionen auszugehen. Anwendung findet die Therapie bei Gewebedestruktion in größerer Tiefe, etwa bei malignen Melanomen der Aderhaut, welche durch eine Brachytherapie von der Skleraseite aus nicht vollständig erreichbar sind. Hier erfolgte erstmalig der Einsatz der Optoakustik zur Temperaturmessung während der CW- Laserbestrahlung (Kandulla et al., 2006). Diese Arbeitsgruppe legte die rechnerischen und physikalischen Grundlagen.

Die angewendete optoakustische Temperaturmessfrequenz bei der TTT betrug $f = 5 \text{ Hz}$, womit nur alle 200 ms eine Messung erfolgte. Der entscheidende Entwicklungsschritt zur Anwendung des optoakustischen Messverfahrens im Rahmen der Photokoagulation war die Steigerung der Messfrequenz. Das hier vorgestellte Verfahren verfügt über eine Messfrequenz von 1 kHz, also 1 Messung pro Millisekunde, womit eine ausreichend hohe Datendichte geschaffen wird, zur Darstellung des Temperaturverlaufes während des

kurzen Koagulationsvorganges. Die Messung erfolgt im jeweiligen Behandlungsareal und berücksichtigt somit die ortsabhängigen individuellen anatomischen Bedingungen. Optoakustische Messungen und Therapiebestrahlung finden durch die konfokale, koaxiale Einkoppelung des Messlasers zum Behandlungslaser in exakt demselben Zielvolumen statt. Die Kombination des hochfrequenten optoakustischen Messverfahrens mit einer automatischen Rückkopplung zum Photokoagulationsgerät ermöglicht die Echtzeit-Dosimetrie (Brinkmann et al., 2012; Schlott et al., 2012).

4.2.2 Automatische Dosiskontrolle mittels temperaturabhängig gesteuertem Photokoagulationslaser

Unsere Arbeitsgruppe befasst sich mit dem Thema der Photokoagulation unter Anwendung eines Lasergerätes, der über eine automatische Dosiskontrolle verfügt. Der Temperaturverlauf wird nicht-invasiv und in Echtzeit während des Koagulationsvorganges für das erfasste Gewebenvolumen optoakustisch gemessen und mittels der Wärmeleitungsgleichung im Zentrum der entstehenden Läsion aus den Daten errechnet. Mit Erreichen einer bestimmten Solltemperatur erfolgt die automatische Abschaltung des Lasers und der Koagulationsvorgang wird beendet. Die Steuerung des Lasers erfolgt anhand modifizierter Arrheniuskurven, welche den Zusammenhang zwischen Temperatur, Expositionszeit und entstehenden Gewebeschaden darstellen. Läsionsgröße und Laserleistung werden vorab eingestellt, die Expositionszeit wird durch die automatische Dosiskontrolle gesteuert. Wir konnten zeigen, dass eine prospektive Intensitätsauswahl zuverlässig zur gewünschten Läsionsintensität führt. Eine Nachjustierung der Laserleistung anhand der entstandenen Weißfärbung ist mit diesem Verfahren nicht notwendig.

Die Temperaturmessung unter Nutzung der Optoakustik wurde am Schweineauge ex vivo und am Kaninchenauge in vivo erfolgreich durch unsere Arbeitsgruppe getestet (Brinkmann et al., 2012).

Der Steuerungsalgorithmus beruht auf einer Modifikation der Arrheniustheorie, wie in Kapitel 2 ausführlich erläutert, (Birngruber et al., 1985). Der Schritt zur automatischen Abschaltung führte über eine weitere Studie unserer Arbeitsgruppe, in welcher ca. 1000 über- und unterschwelligen Läsionen anhand des Schwellenkriteriums „Sichtbarkeit im Fundusfoto nach 1 Std.“ ausgewertet wurden. Hierdurch konnte ΔE = Aktivierungsenergie (siehe Abb. 1) auf 273 kJ/mol bestimmt werden. Es folgte die Bestimmung optoakustischer Schwellen zu verschiedenen Bestrahlungszeit- und Läsionsdurchmesser-Kombinationen, bei der mit 50- bzw. 95%iger Wahrscheinlichkeit eine funduskopisch sichtbare Läsion entsteht. Anhand dieser Schwellen konnte dann eine Arrheniuskurve adaptiert werden. Hiermit lässt sich für diesen bestimmten Bestrahlungsdurchmesser die Temperaturschwelle für jede beliebige Bestrahlungszeit berechnen, worauf der Abschaltalgorithmus für das Photokoagulationsgerät basiert (Schlott et al., 2012).

Die Funktionalität des Steuerungsalgorithmusses, der die Schaffung einer gewünschten Läsionsintensität ermöglicht, konnte am Kaninchen in vivo erfolgreich gezeigt werden. Die so erzeugte Läsionsstärke zeigte ein sanftes homogenes Erscheinungsbild gleicher Größe

und war reproduzierbar. Das Ergebnis war weitestgehend unabhängig zur voreingestellten Laserleistung und den anatomischen Gegebenheiten. Schlussendlich wurde hier die Hypothese aufgestellt, dass mit Anwendung anderer Feedbackalgorithmen die Möglichkeit bestünde, unterschiedliche Läsionsintensitäten zu generieren (Koinzer et al., 2012).

Die vorliegende Studie belegte dieses, indem sie anstrebte fünf TTC- Läsionsintensitäten zu generieren und erfolgreich den Nachweis führte, dass diese fünf Läsionsgruppen erstens: in sich über ein homogenes Erscheinungsbild verfügten und zweitens: fünf unterschiedliche Intensitätsstufen vorwiesen (IV). Die Intensitätsklassen entsprechen dem Spektrum der klinischen Anwendungsmöglichkeiten: von sehr sanften, funduskopisch unsichtbaren Läsionen, welche für die zentrale Behandlung einsetzbar wären, bis hin zu kräftigen Läsionen für die panretinale Anwendung. Durch die im Vorfeld erstellte bildmorphologische Klassifikation ist der Intensitätsgrad objektivierbar. Mit Vorauswahl einer bestimmten TTC- Läsionsstärke am Lasergerät ist damit die Möglichkeit gegeben, eine klare prospektive Aussage über das zu erwartende Schadensausmaß zu machen.

4.2.3 Limitationen des optoakustischen Temperaturmessverfahrens und technische Grenzen der temperaturgestützten Echtzeit- Dosimetrie

Das Verfahren der optoakustischen Temperaturmessung hat gewisse technische Grenzen. Bis zu einer Temperatur von ca. 110 °C lassen sich optoakustische Druckmesswerte in Temperaturen umrechnen. Die genaue maximal umzurechnende Temperatur schwankt geringfügig als Folge der Konversionsfunktion, in Abhängigkeit zur Bestrahlungsdauer.

Hohe Temperaturen können an den Melanosomen in RPE- Zellen Verdampfungen auslösen und zur Entstehung von Kavitationsblasen führen. Die Blasenbildungsschwelle wurde experimentell bestimmt und liegt etwa bei 140 °C (Brinkmann & Birngruber, 2007). Während die Blasenbildung bei der Selektiven Retinatherapie (SRT, siehe S. 41) den eigentlichen therapeutischen Effekt darstellt, erzeugt sie jedoch für die optoakustische Temperaturmessung ein massives Störsignal. Die Pulsenergie des optoakustischen Messlasers liegt im Mittel zwar deutlich unterhalb dieser Schwelle, jedoch kommt es durch Interferenzphänomene innerhalb der Laserfaser zur Specklebildung. Das bedeutet, es kann zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Lichtleistung (Lasergranulation) auf die bestrahlte Fläche kommen, so dass punktuell die Kavitationsschwelle überschritten wird. Solche Blasen bilden starke Druckwellen, welche das optoakustische Signal zur Temperaturmessung überlagern/ übertönen und die Temperaturberechnung verhindern.

Das Zeitfenster der automatischen Laserdosierung lag bei den Studienläsionen zwischen 7-800 ms. Auch wenn Abschaltzeiten bis 4 ms im Prinzip technisch möglich sind, wird die Dosierung bei sehr kurzen Zeiten technisch bedingt ungenau. Bei einer Temperaturmessfrequenz von 1 kHz wird 1 Messung pro Millisekunde vorgenommen. Je kürzer die Abschaltzeiten, desto weniger Messungen bilden die Grundlage zur Berechnung der Abschaltung (vergl. Kap. 2.1). Insbesondere bei starkem Temperaturanstieg kann ein Signalrauschen überproportionale Fehler hervorrufen (vergl. Abb. 5). Aufgrund der Verzögerung durch die Rechenzeit und die Trägheit des abschaltenden Systems wird noch

eine gewisse Zeit nach dem Erreichen des Zielkriteriums weiterbehandelt, so dass für sehr kurzen Zeiten hier die Tendenz zur Überbehandlung besteht.

Die maximale Behandlungsdauer von 800 ms legten wir unter anderem zur Vermeidung übermäßiger Bewegungsartefakte fest. Hierin verbergen sich mehrere Fehlerquellen: Bei unkontrollierter Bewegung des Bestrahlungsareals kommt es aufgrund des Ortwechsels zu keiner berechenbaren Temperaturentwicklung. Die ursprüngliche Kalibrierung des Signals fand auf einem anderen Netzhautareal statt, mit seiner ortsspezifischen Pigmentierung, als auf der tatsächlich bestrahlten Region. Um die Bewegungsartefakte in axialer Richtung rechnerisch zu reduzieren, kamen zusätzlich Hochpassfilter zum Einsatz.

Auch erfolgte die Festlegung des oberen Grenzwertes zur Bestrahlungsdauer, da die von der Arrheniuskurve abgeleitete Abschaltfunktion sich als umgekehrte Exponentialfunktion darstellt. Dies führt bei langen Bestrahlungszeiten zu einem sehr flachen Verlauf, was zur Folge hat, dass nur geringe Temperaturänderungen oder -messfehler zu einer unverhältnismäßigen Veränderung der Expositionszeit führen (vergl. Abb. 2). Für solche Fälle des negativen Signaloffsets durch starke Koagulation stellte die Obergrenze der Bestrahlungszeit eine Sicherheit gegen unkontrollierte, unbegrenzte Überbehandlung dar. Das ideale Zeitfenster definieren wir zwischen 10- 800 ms bzw. 20- 300 ms. Wir versuchten die Laserleistungen so zu wählen, dass die automatisch gesteuerten Läsionen größtenteils innerhalb dieser Zeit den gewünschten Effekt erzielten. Durch umsichtige Auswahl geeigneter Leistungseinstellungen wurde der therapeutische Bereich eingehalten.

Wir verwendeten in unseren Versuchen Laserleistung zwischen 20 und 66 mW, um im vorgegebenem Zeitfenster die angestrebten Effektstärken zu erzielen. Bei niedrigen Laserleistungen < 31 mW sank der Anteil sichtbarer Läsionen, es kam trotz maximaler Bestrahlungsdauer von 800 ms keine ausreichende Koagulation mehr zustande. Bei zu hohen Leistungen entsteht der angestrebte Effekt schneller, als das System reagieren kann und es besteht die Gefahr der Überbehandlung. Für eine klinisch relevante Überbehandlung müsste der Laser stark überdosiert sein, wenn bei einer Bestrahlungszeit von 20- 300 ms gezielt und damit innerhalb des kürzest möglichen Abschaltintervalls von 4 ms, eine gravierende Überbehandlung erzeugt werden sollte. Dieses Szenario dürfte im klinischen Alltag nur als grober Behandlungsfehler auftreten. In unseren Versuchen kam es in keinem Fall zu schweren unerwünschten Nebeneffekten, wie z.B. Ruptur oder Blutung.

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die Theorie über den Zusammenhang von Temperatur und Optoakustikamplitude nur Gültigkeit hat, wenn der Absorber über konstante Gewebeeigenschaften verfügt. Während der Photokoagulation ist dies nicht der Fall, da eine Umwandlung von unkoagulierte zu koagulierte Gewebe stattfindet, mit Veränderungen auf biochemischer und molekularer Ebene. Die Kalibrierung des optoakustischen Signals verliert seine Gültigkeit und die Temperaturmessung wird, insbesondere bei hohen Temperaturen, ungenau.

Wir fanden empirisch, dass die Signalstärke der Optoakustik bei starken Koagulationen abnimmt, so dass ein scheinbarer Temperaturabfall verzeichnet wird, obwohl reell die Temperatur zunehmen dürfte. Die automatische Abschaltung des Lasers kommt somit

nicht oder zu spät zum Tragen, da der Sollwert fälschlicherweise nicht bzw. verzögert erreicht wird. Insbesondere die höheren **TTC- Läsionsgruppen** sind beeinträchtigt und büßen an Homogenität ein (IV). Läsionen der **TTC- Läsionsgruppe 5** sind stärker, aber insgesamt inhomogener als Läsionen der **TTC- Läsionsgruppe 4** (vergleiche Abb. 7 und 15). Diese Variabilität ist ebenfalls erkennbar an den Box-Plots in Abb. 20, sowie in der Spannbreite der **OCT- Schadensklassen** pro **TTC- Läsionsgruppe**, vergl. Abb. 22. Die obere Intensitätsgrenze, die sicher mit diesem Verfahren produziert werden kann, scheint somit etwa bei **TTC- Läsionsgruppe 5** zu liegen. Dies entspricht einer mäßig- kräftigen Läsionsintensität für die panretinale Anwendung. Es gibt Indikationen der Laserphotokoagulation, die kräftigere Läsionen erfordern, wie etwa die Retinopexie. Für diese Indikationen wäre das hier vorgestellte Dosimetrieverfahren in der vorliegenden Form, ohne weitere Adaption des Regelalgorithmus, nicht einsetzbar.

Schlussendlich muss bedacht werden, dass es eine natürliche und damit unbeeinflussbare, biologische Varianz der Reaktionen auf einen identischen Reiz gibt. Dies ist ein weiterer Faktor, der die Präzision der erzeugten Läsionen beeinträchtigen kann. Zum anderen sind Messungenauigkeiten, sowohl Fehlertoleranzen der Läsionsbewertung als auch der Mess- und Steuerungstechnik zu diskutieren. Diesen Fehlerquellen sind wir durch bestmögliche Kalibrierung, Einführung von standardisierten Auswerteprotokollen und Auswertung durch mehrere Untersucher begegnet. Dennoch bleibt auch trotz optimiertem Vorgehen eine gewisse Restungenauigkeit bestehen.

4.2.4 Anwendungsmöglichkeiten optoakustischer Echtzeit-Dosimetrie

Ein innovativer Fortschritt wäre die Anwendung der Echtzeit- Dosimetrie bei Pattern-/ Musterlasern. Anstelle einer einzelnen Läsion wird hier mit jedem Auslösen ein Muster von bis zu 25 Herden in kurzer Folge appliziert, die Expositionszeiten belaufen sich auf 20- 30 ms je Einzelherd. Die Laserleistung kann bis dato nur für das gesamte Muster voreingestellt werden. Hier würde eine optoakustische Messung und automatische Anpassung der Laserleistung zwischen den Einzelläsionen, entsprechend der vorliegenden anatomischen Begebenheiten, eine deutliche Verbesserung darstellen, zumal sich die therapeutische Breite der Photokoagulation mit Abnahme der Bestrahlungsdauer reduziert, so dass Rasterlaser ein erhöhtes Risiko für Fehldosierungen haben.

Ein weiterer technischer Fortschritt stellt die navigierte Photokoagulation dar (z.B. NAVILAS®). Hierbei wird das Bestrahlungsareal nicht mehr manuell vom Behandler über das Kontaktglas platziert, sondern anhand eines Fundusfoto oder Fluoreszenzangiogramm am Bildschirm per Mausclick gewählt (Kozak et al., 2011) und durch das Gerät automatisch an die gewünschte Stelle appliziert. Eine funduskopische Effektkontrolle eines jeden Herdes und die manuelle Laserleistungsanpassung sind jedoch noch notwendig. In Kombination mit der automatischen Dosiskontrolle wäre die Laserkoagulation in Zukunft vorstellbar als vollautomatische Behandlung nach ärztlicher Vorgabe, ähnlich der radioonkologischen Bestrahlungsplanung und -durchführung.

4.3 KLINISCHE BEDEUTUNG DER LÄSIONSKLASSEN

Aus klinischer Sicht sind drei Läsionsintensitäten von besonderem Interesse:

- (1) Thermisch stimulierende Läsionen: Echte unterschwellige Läsionen, die keine Nekrosen oder Apoptosen induzieren, aber einen biologisch wirksamen Temperaturstimulus in das Gewebe einbringen.
- (2) Subvisible Lesions: Funduskopisch unsichtbare Läsionen, die nur einen sehr sanften thermischen Schaden induzieren und z.B. für eine Behandlung des zentralen Fundus nahe der Fovea centralis geeignet sein könnten.
- (3) Modulationen der klassischen, sichtbaren Photokoagulationsläsionen für zentrale und panretinale Anwendungen.

4.3.1 Thermisch stimulierende Läsionen

Läsionen der **OCT- Schadensklasse 0** sind nach den OCT- Validitätskriterien unterschwellig, denn sie waren weder funduskopisch sichtbar noch in der OCT nachweisbar.

Die Temperaturschwelle für Schäden am RPE hat die Arbeitsgruppe von Denton auf 54°C bestimmt (Denton et al., 2011). Ausgehend von dieser Temperaturschwelle ist bei einer Spitzenendtemperatur > 54 °C die RPE- Schadensschwelle überschritten und ein thermischer Schaden ist zu erwarten. Bei einer Spitzenendtemperatur < 54 °C, OCT-morphologischer Unversehrtheit und intaktem RPE wäre von einer reinen thermischen Stimulation ohne thermischen Netzhautschaden auszugehen. Es würde keine Nekrosen- und Narbenbildung induziert werden und eine Wiederholung dieser Behandlungen wäre grundsätzlich möglich. Typische Nebenwirkungen ganzer Photokoagulationsbehandlungszyklen, wie Einschränkungen beim Nacht-/ Dämmerungssehen, Kontrastsehen oder Gesichtsfeldausfälle (Skotome) würden somit vermieden werden.

Eine thermische Stimulation ohne Zelluntergang führt zur Stimulation des Gewebes und damit zur Expression von Hitzeschockproteinen (HSP70) (Sramek et al., 2011). Eine Studie mit einem modifizierten Pattern- Scanning- Laser (PASCAL) wies die Sicherheit und Wirksamkeit der photothermischen Stimulationstherapie im Rahmen der Behandlung von Retinopathia centralis serosa (RCS) nach. Es kam zum Rückgang der Flüssigkeitsansammlungen und zum Anstieg der Sehschärfe (Lavinsky & Palanker, 2015). Dieser PASCAL- Laser wurde mit dem sog. „Endpoint Management“ genutzt. Initial werden dabei einige funduskopisch sichtbare Titrationsläsionen appliziert, anhand der hierfür notwendigen Leistung wird die Expositionszeit und Laserleistung für die größere Anzahl folgender Läsionen auf ein unschädliches Niveau hin berechnet. Im Gegensatz zu der hier vorgestellten Methode werden ortsabhängige Pigmentvariationen nicht berücksichtigt.

Durch die hier angewandte Methode der Temperaturmessung während des Koagulationsvorganges ließ sich für jede Einzelläsion nachweisen, ob die thermische Schadensschwelle des RPE überschritten wurde. Im Hinblick auf das Überschreiten der Temperaturschwelle spielt die Expositionsdauer eine untergeordnete Rolle, so dass die Auswertung der Temperaturdaten in diesem Fall gestattet ist. Läsionen der **TTC-**

Läsionsgruppe 1 zeigten im Median eine Temperatur von 54,6 °C, lagen somit knapp oberhalb der durch Denton bestimmten Temperaturschwelle.

Die Erzeugung solcher thermisch stimulierenden Läsionen bei zeitgleicher Berücksichtigung individueller Pigmentierungs- und Transmissionsschwankungen ist mit der hier vorgestellten Methode möglich. Bei Auswahl einer entsprechenden Arrheniuskurve, deren Funktion so gewählt sein muss, dass die Abschaltung des Lasers vor Erreichen der RPE-Schadensschwelle stattfindet, wäre es möglich solche Läsionen sicher zu generieren.

4.3.2 Subvisible Lesions

Subvisible - der Begriff bezieht sich auf die funduskopische Unsichtbarkeit.

Läsionen der **TTC- Läsionsgruppen 1 und 2** (**OCT- Schadensklasse 1- 3**) verblieben zu 83 % bzw. 44 % der Läsionen funduskopisch unsichtbar, waren jedoch in der OCT zu 68 % bzw. zu 90 % detektierbar und im Verlauf beobachtbar. Die Durchmesser dieser Subvisible Lesion betrugen 129 µm (**TTC- Läsionsgruppe 1**) bzw. 148 µm (**OCT- Schadensklasse 1**), was etwa dem Bestrahlungsdurchmesser von 133 µm entspricht. Bei Läsionen, die in der OCT detektierbar waren, ist nicht ausschließlich von einer thermischen Stimulation auszugehen, da ein laserinduzierter Schaden nachweisbar war. Die erfassten Spitzenendtemperaturen bestätigen das Überschreiten der RPE-Schadensschwelle. Läsionen der **TTC- Läsionsgruppe 1 und 2** zeigten im Median eine Temperatur von 54,6 bzw. 57,1 °C.

In Pilotstudien wurden selektive RPE-Läsionen, eine Sonderform der Subvisible Lesions, erfolgreich eingesetzt bei diabetischer Makulopathie, RCS, zur Drusenreduktion bei trockener AMD und bei chronischer subretinaler Flüssigkeit nach Amotiochirurgie (Roider, et al. 2000; Roider et al., 2010; Koinzer et al., 2008). In der Selektiven Retinatherapie, deren Läsionen als subvisible bezeichnet werden können, kommt ein abgewandeltes Lasergerät zum Einsatz. Hier finden nanogepulste Grünlaser Verwendung. In fester Abfolge werden 100 Pulse mit einer Länge von 1,7 µs abgegeben. Diese Mikropulslasertechnik erzeugt als therapeutischen Effekt eine Mikroblassenbildung an den Melanosomen des RPE, deren Druckwellen sich optoakustisch genau wie in der hier beschriebenen Temperaturmesstechnik gut erfassen lassen, aber dann nicht zur Temperaturmessung verwendet werden. Sie dienen bei den funduskopisch nicht sichtbaren Läsionen mit anderem Auswertalgorithmus zur Effektkontrolle (Koinzer et al., 2008; Roider et al., 1999). Die Mikroblassenbildung sorgt für eine kurzfristige Vergrößerung des Zellvolumens im RPE. Dies kann aufgrund thermomechanischer Laser- Gewebe- Wechselwirkung zur Zelldisruption führen, wenn sie in ausreichendem Ausmaß auftritt. Die Zerstörung von RPE-Zellen initiiert eine Wundheilungsreaktion, die zu einer Steigerung des Metabolismus und zu einer Regeneration des RPE führen soll (Brinkmann et al., 2006). Dieses Verfahren kann selektiv Zellen des RPE zerstören unter Schonung der übrigen retinalen Schichten.

Viele Studien haben in der Zwischenzeit aufzeigen können, dass Subvisible Lesions beim diabetischen Makulaödem mittels eines gepulsten Lasers genauso gut (Figueira et al., 2009) oder bei Anpassung der Behandlungsparameter sogar besser wirksam sind (Lavinsky et al., 2011) als die Standard- ETDRS- Behandlung. Die Arbeitsgruppe um Lutrull wies die

Wirksamkeit eines MikropulsLasers bei diabetischem Makulaödem nach und stellte die Notwendigkeit typischer Photokoagulationsschäden in Frage (Luttrull et al., 2008). In kleineren Studien konnte auch im Rahmen panretinaler Behandlungen nachgewiesen werden, dass Subvisible Lesions (Luttrull et al., 2008) oder milde Behandlungen (Bandello et al., 2001) vergleichbar gut zu wirken scheinen, wie eine klassische Behandlung mit deutlicher Weißfärbung der applizierten Läsionen. Jedoch war die Follow-up-Dauer gering, so dass im beobachteten Zeitfenster keine erhöhten Komplikationsraten auftraten.

4.3.3 Modulationen der klassischen Photokoagulationsläsionen

Die **TTC- Läsionsgruppen** 2- 5 (**OCT- Schadensklassen** 3- 6) entsprechen den klassischen, funduskopisch sichtbaren Photokoagulationsläsionen unterschiedlicher Wirkungsstärke. Grundsätzlich muss in zwei Bereiche untergliedert werden: Sanfte Läsionen mit minimaler Graufärbung des Gewebes, wie sie nach der ETDRS für eine zentrale Behandlung empfohlen werden, und kräftigere Läsionen, welche panretinal gemeinhin zur Anwendung kommen.

Photokoagulationsläsionen für die zentrale Anwendung

Bis heute findet die Effektsteuerung der etablierten CW- Photokoagulation anhand der funduskopischen Weißfärbung statt. Das bedeutet, es wird versucht, eine Läsionsstärke visuell zu titrieren, die für das menschliche Auge gerade noch schwach wahrnehmbar am Fundus erscheint. Diese Läsionsstärke entspräche jedoch bereits einer Läsion mindestens der **OCT- Schadensklasse** 3, wie sie z. B. auch durch Einstellung der **TTC- Läsionsgruppe** 3 automatisch erzeugt werden kann.

Selbst bei vorsichtiger, konventioneller Photokoagulation werden diese sanften Läsionsklassen kaum erreicht und die thermische Zerstörung der Photorezeptoren mit konsekutivem Laserskotom kann nicht verhindert werden (Framme et al., 2008). Auch unsere eigenen Studiendaten belegen, dass selbst die sanftesten Leistungen, welche auf klinisch knapp oder nicht sichtbare Läsionen zielten bei einer standardmäßigen Bestrahlungsdauer von 200 ms keine **OCT- Schadensklasse** 0 und 1- Läsionen und nur 3 Läsionen der **OCT- Schadensklasse** 2 erzeugten.

Im Rahmen der modernen Photokoagulation sind insbesondere diese schwer zu kontrollierenden **OCT- Schadensklassen** 0, 1 und 2 von klinischem Interesse, da diese sanften Läsionsstärken eine Restitutio ad integrum und damit möglicherweise wiederholbare Behandlungen des gleichen Netzhautareals, z.B. auch unter der Fovea centralis selbst, erlauben könnten (Paulus et al., 2008). Sie entsprechen Läsionen der **TTC- Läsionsgruppen** 1 und 2, welche bei Anwendung der automatischen Abschaltung sicher und reproduzierbar erzeugt werden können.

Photokoagulationsläsionen für die panretinale Anwendung

Die höheren **TTC- Läsionsgruppen** 3- 5 (**OCT- Schadensklassen** 3- 6) erzeugen intensivere Photokoagulationsläsionen. Sie sind anhand ihrer Weißfärbung funduskopisch direkt im Anschluss der Photokoagulation sichtbar, aber nur begrenzt objektiv beurteilbar. Sie zeigen eine zunehmende Größe und sind von ansteigender Intensität.

Vorhersagbare und verlässliche Läsionseigenschaften, wie der Läsionsdurchmesser, könnten den Photokoagulationsprozess optimieren, wenn sie sich reproduzierbar mit geringer Schwankungsbreite applizieren lassen. Behandlungsrichtlinien und Rasterdichten bei Grid, Mild- oder Full- Scatter, könnten überarbeitet werden, wie es beispielsweise die klinischen Ergebnisse einer Studie um Lavinsky nahelegen (Lavinsky et al., 2011). Der Durchmesser der tatsächlich induzierten Läsion, nicht der Bestrahlungsdurchmesser, ist hier der entscheidende Faktor, der die Anzahl der zu applizierenden Läsionen beeinflusst. Dieser ist für die routinemäßige klinische Anwendung sehr schwankend, im Einzelfall weitgehend unbekannt (Saeger et al., 2016). Durch die Verwendung von **TTC-Läsionsgruppen** könnte dies deutlich verlässlicher definiert werden und wäre ein Ansatzpunkt zur Optimierung der konventionellen Behandlungsmethoden.

Ein weiteres Risiko applizierter und evtl. unnötig intensiver Läsionen ist das langfristige Wachstum der Photokoagulationsnarben. Es ist nicht geklärt, unter welchen Umständen die Narben wachsen, aber eine Zunahme des Ausbreitungsrisikos mit der Herdintensität ist wahrscheinlich. Dadurch besteht nachträglich eine Bedrohung ursprünglich unkoagulierter, funktionell intakter Bereiche. Eine Reduktion des Photokoagulationseffektes auf das notwendige therapeutische Maß wichtig, insbesondere bei Behandlungen nahe der Fovea centralis (Framme et al., 2008).

4.4 REFLEXION DER VERFAHREN

4.4.1 Läsionsdokumentation in Fundusfarbfotographie, OCT, Histologie und Fluoreszenzangiographie

Eine kritische Beachtung der hier verwendeten und erwähnten bildgebenden Verfahren soll die spezifischen Unterschiede herausarbeiten und vergleichen. Die Funduskopie resp. Fundusfarbfotographie kann einen strukturellen Überblick geben, der in Mydriasis jederzeit durchführbar ist. Das Fundusfoto zeigt eine farbliche Aufsicht auf die Retina, während die OCT einen Querschnitt der retinalen Schichten in verschiedenen Graustufen zeigt, entsprechend der strukturellen optischen Eigenschaften. Demgegenüber steht die Mehrfarbigkeit der Histologie, aufgrund der chemischen Affinität der Moleküle zu den Färbungen. Die gebräuchlichste ist die Hämatoxylin- Eosin -Färbung (HE), darüber hinaus gibt es zahlreiche Spezial- und immunhistochemische Färbungen.

Die OCT ist ein nicht- invasives Verfahren, welches im Gegensatz zur Histologie leicht, nicht destruktiv und in größerer Stückzahl erhältlich ist. Longitudinalstudien sind durch technische Einrichtungen am Gerät unkompliziert durchführbar, z.B. einen Eyetracker mit automatischem Retina Tracking (ART) und der AutoRescan™- Funktion ist das Wiederauffinden identischer Bereiche gewährleistet. In Bezug zur zellulären Auflösung ist die OCT der Histologie eindeutig unterlegen (vergl. Abb. 23) - es ist keine ‚in vivo Histologie‘. Die systematische Korrelation von OCT- Befunden und Histologien aus Kaninchen ist für die Bewertung von humanen Befunden relevant, denn hier sind keine bzw. nur wenige Histologien erhältlich (I).

Ein weiteres wichtiges und aussagekräftiges Verfahren ist die Fluoreszenzangiographie (FLA). Sie stellte lange Zeit die klinische Referenzmethode für die Untersuchung funduskopisch unsichtbarer Läsionen dar, wurde allmählich durch die OCT ergänzt und zunehmend von dieser abgelöst. Hierbei wird ein Kontrastmittel, bspw. Fluorescein oder Indocyaningrün, intravenös injiziert und das Anfluten sowie der Verlauf zeitlich beobachtet und bildlich dokumentiert. Retinale Gefäßanomalien und Schäden an der Blut- Retina-Schranke (BRS) kommen so kontrastreich zum Vorschein. Bei Nachweis einer Leckage in der FLA ist von einer laserinduzierten Beschädigung der äußeren oder inneren BRS auszugehen, die Tight Junctions des RPE (äußere BRS) bzw. des Gefäßendothels (innere BRS) sind beschädigt. Die FLA gilt als hoch sensitiv zur Darstellung von RPE- Schäden.

Im Vergleich mit der FLA scheint die OCT ebenfalls über eine hohe Sensitivität für laserinduzierte retinale Schäden zu verfügen. Darauf weisen Daten einer Probitanalyse von Dr. Claus von der Burchard hin. Es wurden Temperaturschwellen ermittelt, für die eine 50-prozentige Wahrscheinlichkeit besteht, nachweisbare Laserläsion zu erhalten. Die Temperaturschwelle für die Nachweisbarkeit einer Läsion belief sich in der FLA auf 64,8 °C und war damit annähernd gleich mit der OCT- Schwelle 1 Std. nach der Applikation, welche 65,0 °C betrug. Darüber hinaus wurden folgende ED-50-Schwellen erfasst: für sofortige Sichtbarkeit nach Applikation 68,9 °C und für funduskopische Sichtbarkeit 1 Stunde nach Applikation 67,4 °C (Dr. Claus von der Burchard, persönliche Kommunikation).

Eine FLA hätte die Ergebnisse dieser Studie um interessante Aspekte und Erkenntnisse erweitern können. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf die 22 Läsionen, welche nicht in der OCT detektierbar waren, obwohl sie sich sicher innerhalb des Abbildungsareales befanden. Es war uns leider nicht möglich eine FLA durchzuführen, da nach einem ca. vierstündigen Zeitfenster der Versuchsdurchführung: Laserapplikation, Fundusfarbfotographien und umfassende OCT- Bildgebung die brechenden Medien der Kaninchenaugen, insbesondere die Hornhaut, zu undurchsichtig waren, um eine interpretationsfähige FLA zu ermöglichen. Wir vermuten, dass die Sichtbarkeitsschwelle der FLA etwa bei [OCT- Schadensklasse 1](#) liegt, was mit den zitierten Daten der Probitanalyse am Kaninchen von Dr. Claus von der Burchard gut in Überklang zu bringen wäre.

4.4.2 Tierexperimentelle Studien

Das Kaninchen als Photokoagulationsmodell

Das Kaninchen ist das am meisten verwendete Versuchstier in der Forschung zur retinalen Photokoagulation. Es ist für in vivo- Versuche ein ideales Versuchstier: Es ist klein und einfach in der Handhabung, insbesondere in Hinblick auf das Handling innerhalb von Versuchslaboren und die Unterbringung während des Studienzeitraumes. Ihre Augäpfel haben annähernd die gleiche Größe wie die des Menschen, so ist es während der Versuchsdurchführung möglich, dieselben Kontaktgläser zu verwenden. Die Wahl der Rasse fiel in dieser Studie auf Chinchilla Bastard, sie zeigen einen äußerst homogen pigmentierten Augenhintergrund. Ein Unterschied zur humanen Retina ist das Fehlen der Makula. Stattdessen verfügen Kaninchen über einen Markstrahl, der horizontal zur Papille

verläuft, vergl. Abb. 7. Unter diesen myelinisierten Nervenfasern liegt der Sehistreifen, dies ist ein verdickter Netzhautstreifen, welcher vermutlich über die höchste Sehfunktion verfügt. Im strukturellen Aufbau unterschieden sich die Retinae nicht, die Folge der retinalen Schichten sind gleich, jedoch ist die vaskuläre Versorgung unterschiedlich. Ebenso ist die Höhe verschieden: Kaninchenretina misst etwa 150- 180 µm unterhalb des Markstrahls, die humane Netzhaut beläuft sich zentral auf etwa 250 µm.

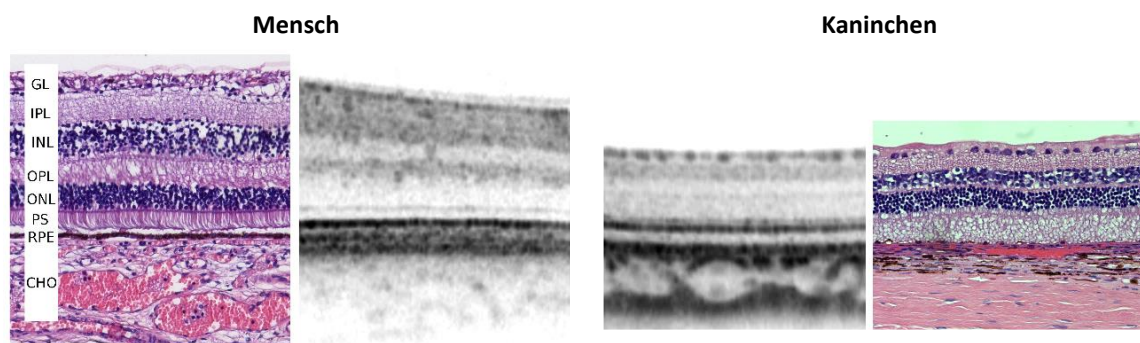


Abbildung 23: Gegenüberstellung Histologie und OCT: Mensch versus Kaninchen

Direkter Vergleich zwischen menschlicher Retina und die eines Kaninchens. Der histologische Paraffinschnitt ist in Hämatoxylin- Eosin gefärbt und in 200-facher Vergrößerung abgebildet, die OCT-Bilder wurden entsprechend angepasst. Als nahezu durchgängige Basis kommt das RPE zum Liegen.

Bei Fragestellungen bezüglich der zellulären Geschehnisse, z.B. der Zytokinexpression, sollte dem Forschenden die Grenzen des Tiermodells bewusst sein. Inwieweit die biologischen Reaktionen der doch unterschiedlichen Gewebe verschiedener Spezies vergleichbar sind, bleibt offen. Dennoch sind Tierversuche mit bildgebenden Verfahren und histologischen Aufarbeitungen eine unumgängliche Voraussetzung für die Sicherheitsprüfung einer neu entwickelten Technik. Sie ermöglichen eine Einschätzung vorzunehmen über den zu erwartenden Effekt an humaner Netzhaut. Anhand der gewonnenen Ergebnisse erfolgt in der Regel die Entscheidung über die Zulassung in der Humanmedizin.

Vergleich der Koagulationsverhalten humaner Retina zu Kaninchenretina

In einer Studie mit Anwendung des optoakustischen Temperaturmessverfahrens während der Photokoagulation an humaner pathologisch veränderter Retina, wurde eine ebenfalls sieben Stufen umfassende Klassifikation präsentiert (Koinzer et al., 2012). Als Gemeinsamkeiten der OCT- Morphologie finden sich bei den sanfteren Läsionsklassen die typischen zarten Veränderungen in der äußeren Körnerschicht und bei der stärksten Läsionsklasse die ovale Aufhellung in Höhe der Photorezeptorsegmente. An Kaninchenretina lässt sich bei stärkeren Läsionen regelmäßig eine Abhebung der neurosensorischen Schichten mit exsudativer Flüssigkeitsansammlung beobachten, dieses Phänomen zeigt sich beim Menschen nur selten. Dafür finden sich an humaner Retina häufig ringförmige RPE-Abhebungen am Läsionsrand, was beim Kaninchen nicht vorkommt. Ein ausschließlich beim Menschen beobachtbares Ereignis ist das Vorkommen von Läsionen, die nach einer Woche sichtbar wurden, jedoch 1 Stunde post applicationem nicht in der OCT detektierbar waren.

Eine Analyse der unterschiedlichen Koagulationsverhalten von humaner Retinae und Kaninchenretinae wurde in einer weiteren Studie (III) unserer Arbeitsgruppe erstellt. Etwa 600 Läsionen vom Kaninchen (\varnothing 133 μ m, 4- 800 ms) wurden histologisch untersucht und verglichen mit den OCT-Bildern, der hier vorgestellten Studie. Der Bezug zum Menschen erfolgte anhand 155 Läsionen (\varnothing 100 μ m, 50- 200 ms) mit Auswertung in der OCT. Das Ergebnis war die Entwicklung von Verfahrensanweisungen und Kalibrierungssystemen, um der histologischen Verzerrung, dem Problem der axialen/ lateralen Auflösung der OCT und den unterschiedlichen Dimensionen gerecht zu werden.

Mensch und Kaninchen scheinen einerseits gemeinsame typische Koagulationsschäden zu zeigen und andererseits über eine speziesspezifische Vulnerabilität zu verfügen. Diese zu kennen ist Voraussetzung zum Übertragen der Ergebnisse aus Tierversuchen in die humane Forschung. Eine direkte Analogie von Methoden und Technik hilft vor dessen Anwendung am Menschen, eine Vorhersage über den zu erwartenden Effekt zu treffen, und verbessert die Verständlichkeit der laserinduzierten Veränderungen in menschlichem Gewebe.

4.5 ALTERNATIVE VERFAHREN ZUR PHOTOKOAGULATION

Wenngleich die Alternativtherapien keinen direkten Zusammenhang zur vorliegenden Studie haben, soll aufgrund ihrer großen Bedeutung in der heutigen Augenheilkunde zusammenfassend insbesondere auf die intravitreale Medikamentengabe eingegangen werden, um den Stellenwert des Lasers im Zeitalter der intravitrealen Injektionstherapie zu definieren.

Mit Einführung der intravitreal gespritzten VEGF- blockenden Angiogenesehemmer (VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor) erhielt ein neues Therapieprinzip Einzug in die Ophthalmologie. Die Medikamente, Bevacizumab (Avastin®) und Ranibizumab (Lucentis®), beides VEGF- Antikörper oder Aflibercept (Eylea®), ein löslicher VEGF- Rezeptor, werden in den Glaskörperraum appliziert und hemmen das Einwachsen neuer Gefäße.

Zu einem grundlegenden Erfolg haben die Angiogenesehemmer bei der feuchten AMD geführt. Patienten haben deutlich von der Anwendung profitieren können. In der MARINA-Studie konnte 2006 gezeigt werden, dass bei 95 % der Patienten, die monatlich über zwei Jahre an der Therapie teilnahmen, sich der Visus stabilisierte bzw. bei einem Drittel der Patienten sich um mindestens 3 Reihen verbesserte (Rosenfeld et al., 2006; Brown et al., 2006). Bei diesem Erkrankungsbild ist der primäre Einsatz von Photokoagulationslasern als Therapeutikum obsolet und wird nur alternativ bei extrafovealer choroidaler Neovaskularisation (CNV) angewendet.

Bei diabetischen und anderen Makulaödemen, z.B. bei Uveitis, ist neben der Anti- VEGF- Therapie die intravitreale Gabe von Steroiden effektiv, um den Visus positiv zu beeinflussen. Im Rahmen des diabetischen Makulaödems war die Photokoagulation ca. 20 Jahre der Goldstandard, bis intravitreale Steroidinjektionen zur Anwendung kamen. Angewandte Wirkstoffe sind Triamcinolon, Dexamethason und Fluocinolon. Der positive Effekt beruht auf der Kontrolle der Entzündungsreaktion und die Verbesserung der Integrität der Blut- Netzhaut- Schranke (Batioğlu et al., 2007). Im Vergleich zu

Angiogenesehemmern sind weniger Injektionen nötig, da je nach Darreichungsform eine längere Wirkdauer als bei der VEGF- Medikation vorliegt. Triamcinolon in kristalliner Form (Kenalog®) hat eine Wirksamkeitsdauer von ca. 3 Monaten, in ein Trägerstäbchen eingebrachtes Dexamethasonpräparat (Ozurdex®) soll bis zu 6 Monaten wirken, und ein Fluocinolon- Implantat (Iluvien®) soll seine Wirksamkeit über 36 Monate lang entfalten können. Die Applikation von Steroiden birgt jedoch die Gefahr der Katarakt- und Glaukomentstehung. Initial schien eine hohe Effektivität vorzuliegen, während der Langzeiteffekt bis heute kontrovers diskutiert wird, insbesondere aufgrund des Confounders der Kataraktentstehung (Diabetic Retinopathy Clinical Research Network et al., 2008). Steroidimplantate stellen eine gute Behandlungsalternative für Patienten mit diabetischem Makulaödem dar, wenn schon ein Kunstlinsenstatus vorliegt.

Innerhalb einer größeren Studie an 854 Augen mit diabetischen Makulaödem wurde der Nachweis erbracht, dass eine schnellere Netzhautabschwellung und damit ein Anstieg der Sehleistung erreicht werden konnte, durch die intravitreale Injektion des VEGF-Hemmstoffes Ranibizumab (Lucentis®) alleine oder in Kombination mit einer Photokoagulationstherapie. Die Verbesserung der Sehleistung fiel stärker aus als bei alleiniger Lasertherapie (Diabetic Retinopathy Clinical Research Network et al., 2010). Aktuell ist bei diabetischen Makulaödem die Photokoagulation Therapie der zweiten Wahl. Im Rahmen der proliferativen diabetischen Retinopathie ist die panretinale Photokoagulation jedoch weiterhin Therapie der Wahl zur Vermeidung bzw. Behandlung der Neovaskularisationen, ebenso bei ischämischen Netzhautverschlüssen (Shah et al., 2011), nicht aber bei verschlussbedingten Makulaödem.

Eine effektive Anti-VEGF-Therapie benötigt wiederholte Anwendungen, die sich in der sog. Upload- Phase, in den ersten Monaten häufen, und kann eine dauerhafte Therapie erfordern. Eine hohe Compliance auf Seiten des Patienten ist notwendig. Darüber hinaus steigt direkt proportional zur Applikationsanzahl das Endophthalmitisrisiko, also das Risiko für schwere, visusbedrohende Wundinfektionen. Weiterhin wird über mögliche systemische Nebenwirkungen debattiert, bedingt durch die Suppression des VEGF-Serumspiegels durch die intraokularen Applikationen. Die Therapiestrategie mittels Angiogenesehemmer hat einen hohen Untersuchungs- und Behandlungsaufwand und verursacht extrem hohe Medikamentenkosten. So behält die Photokoagulation, auch im Zeitalter der Angiogenesehemmer, weiterhin einen hohen Stellenwert als effektives, langwirksames, günstiges und einfach durchzuführendes Therapieverfahren. Möglicherweise wird in diesem Zusammenhang in Zukunft die automatische, temperaturkontrollierte Photokoagulation eine Rolle spielen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die retinale Photokoagulation ist ein unverzichtbarer Bestandteil der augenärztlichen Heilkunst. Die panretinale Anwendung ist im Rahmen ischämischer Retinopathien der therapeutische Goldstandard, deren wichtigsten Beispiele die diabetische Retinopathie und venöse Verschlüsse im retinalen Stromgebiet sind. Diese Erkrankungsbilder gehören zu den häufigsten Erblindungsursachen in den Industriestaaten und weltweit.

Im Rahmen dieser tierexperimentellen Studie wurden 1022 Läsionen in 6 Kaninchenaugen appliziert und über 3 Monate zu festen Evaluationszeitpunkten beobachtet. Von 625 der Läsionen konnten wir OCT- Bilder aufnehmen, für 464 Läsionen gelang es uns, einen vollständigen Datensatz zu erzeugen. 22 Läsionen waren so sanft, dass sie nicht in der OCT detektierbar waren. Es folgte die systematische Sichtung der Bilder, um gemeinsame morphologische Merkmale der laserinduzierten Veränderungen zu identifizieren. Anhand der morphologischen Beschreibung entstand ein siebenstufiges Klassifikationssystem mit fein graduierter Schadensdefinition. Jede dabei gefundene Schadensklasse wurde bezüglich ihrer funduskopischen Sichtbarkeit, dem Durchmesser im Fundusfarbfoto und in der OCT, der Spitzenendtemperatur, der Laserleistung und dem Heilungsverlauf über drei Monate validiert. Die **OCT- Schadensklassen** sind von ansteigender Intensität, wie die zunehmenden Läsionsdurchmesser im Fundusfoto und in der OCT, sowie die Spitzenendtemperaturen belegen. **OCT- Schadensklasse** 0, 1 und 2 waren nur zu 0, 17 bzw. 56 % funduskopisch sichtbar, ließen sich jedoch zu höheren Anteilen in der OCT detektieren. Im Heilungsverlaufes kam es über alle Klassen zu einer Abnahme der Läsionsdurchmesser. Insgesamt stellten sich die Läsionsdurchmesser in der OCT größer dar als im Fundusfoto.

Laserläsionen werden in der klinischen Routine in drei bis vier Läsionsstärken unterteilt mit eher vagen und unzureichenden Beschreibungen wie ‚schwache, mäßige oder kräftige Weißfärbung‘. Bis dato gab es keine Klassifikation, die präzise das morphologische Schadensausmaß definiert. Die hier vorgestellte OCT- morphologische Klassifikation von Photokoagulationsläsionen dient der Optimierung der retinalen Photokoagulation, indem einerseits die Schadens- und somit Intensitätsbeschreibung von Läsionen objektiviert wird, andererseits die Sensitivität der Schadenserfassung im Bereich der funduskopisch unsichtbaren Läsionen verbessert wird.

Die konventionelle retinale Photokoagulation erzeugt ungleichmäßige Läsionen. Die Intensitätssteuerung findet über die manuelle Dosierung der Laserleistung durch den Behandler statt. Hierfür stellt die Weißfärbung des zuletzt bestrahlten Areals das akute Steuerungskriterium dar, jedoch ist diese abhängig vom Beurteilungszeitpunkt. Die Leistungsanpassung gestaltet sich schwierig, insbesondere dann, wenn sanfte, funduskopisch unsichtbare Läsionsstärken appliziert werden sollen. Die Präzision dieser manuellen Dosierung nach visueller Einschätzung und subjektiv geprägter Beurteilung ist daher als suboptimal anzusehen. Gewünscht ist eine kontrollierte Photokoagulation mit reproduzierbaren, gleichförmigen Ergebnissen und der Möglichkeit zur Vorauswahl der Läsionsintensität. Die Photokoagulation sollte unabhängig vom Behandler und den

individuellen anatomischen Begebenheiten des zu behandelnden Auges sein. Ein ortsadaptiertes Effektmonitoring während des Koagulationsvorganges mit prospektiver Intensitätsauswahl wird angestrebt.

In dieser Studie kommt ein Photokoagulationslaser mit einer temperaturabhängig gesteuerten, automatischen Abschaltung zur Anwendung. Aufgrund der Abhängigkeit des Schadensausmaßes von der Netzhauttemperatur nutzten wir den physikalischen Effekt der Optoakustik, um während der Photokoagulation den Temperaturverlauf an der Retina, im Zentrum der entstehenden Läsion, zu erfassen. Hierfür leiteten wir koaxial mit dem Behandlungslaser einen gepulsten, biologisch unschädlichen Messlaser in das Bestrahlungsareal zur Anregung der Optoakustik. Dieses Signal ist von außen an der Hornhaut messbar und dessen Amplitude korreliert mit der aktuell vorliegenden Netzhauttemperatur. Mit diesem Verfahren ist die Temperaturmessung nicht-invasiv und in Echtzeit möglich. Bei Erreichen einer bestimmten Soll-Temperatur wird der Koagulationsvorgang automatisch beendet. Die Abschaltung erfolgt anhand empirisch adaptierter Arrheniuskurven. Sie beruhen auf der Arrheniusgleichung, welche den Zusammenhang von Temperatur, Expositionszeit und den entstehenden Schaden modelliert. Damit ist eine Berechnung des Gewebeschadens als Zeit-Temperatur-Funktion möglich.

Es wurden fünf verschiedene Arrheniuskurven für die automatische Abschaltung definiert, um unterschiedlich starke Läsionsgruppen zu generieren. Die Spannweite der Schadensintensität dieser **TTC- Läsionsgruppen** reichte von funduskopisch unsichtbar bis zu deutlich sichtbaren Weißfärbungen und entspricht somit dem unterschwelligen als auch dem üblichen therapeutischen Bereich. Über einen weiten Leistungsbereich konnten wir homogene Läsionen sicher und zuverlässig reproduzierbar erzeugen. Mit Ansteigen der **TTC- Läsionsgruppe** kam es zu einer Intensitätssteigerung, sichtbar an der Zunahme der Läsionsdurchmesser sowohl funduskopisch als auch in der OCT. Ebenso verhielt es sich im Heilungsverlauf, über drei Monate kam es zu einer Reduktion aller Durchmesser, wobei über die **TTC- Läsionsgruppen** die Zunahme der Läsionsdurchmesser erhalten blieb. Der Läsionsdurchmesser der **TTC- Läsionsgruppe** 3 entsprach annähernd dem Bestrahlungsdurchmesser. Die sanften **TTC- Läsionsgruppen** 1 und 2 waren mit einer funduskopischen Sichtbarkeit von 17 bzw. 38 % überwiegend nicht sichtbar, ließen sich jedoch zu 68 bzw. 94% in der OCT nachweisen. Die Applikation sehr sanfter Läsionen, die funduskopisch nicht sichtbar sind, kann mit diesem Verfahren entscheidend verbessert werden.

Die automatisch temperaturkontrollierte Photokoagulation erlaubt die zuverlässige Applikation ophthalmoskopisch unsichtbarer, milder und moderater Läsionen. Das Koagulationsergebnis wird hiermit unabhängig vom Behandler und den individuellen anatomischen Begebenheiten des zu behandelnden Auges. Es ist das Ziel, die prinzipiell destruktive und fast immer schmerzauslösende Photokoagulation für den Patienten milder und verträglicher zu machen. Gleichzeitig gilt es bei maximaler therapeutischer Effektivität funktionell wichtige Strukturen zu schonen. Dies ist weiterhin die Motivation für die klinische Etablierung einer temperaturbasierten, kontrollierten und automatischen Laserdosierung in Echtzeit.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- A randomized clinical trial of early panretinal photocoagulation for ischemic central vein occlusion. The Central Vein Occlusion Study Group N report (1995). *Ophthalmology* 102 (10), 1434-1444.
- Argon laser photocoagulation for macular edema in branch vein occlusion. The Branch Vein Occlusion Study Group (1984). *American Journal of Ophthalmology* 98 (3), 271-282.
- Argon laser scatter photocoagulation for prevention of neovascularization and vitreous hemorrhage in branch vein occlusion. A randomized clinical trial. Branch Vein Occlusion Study Group (1986). *Archives of Ophthalmology* 104 (1), 34-41.
- Bandello, F., Brancato, R., Menchini, U., Virgili, G., et al. (2001) Light panretinal photocoagulation (LPRP) versus classic panretinal photocoagulation (CPRP) in proliferative diabetic retinopathy. *Seminars in ophthalmology*. 16 (1), 12-18.
- Batioğlu, F., Ozmert, E., Parmak, N. & Celik, S. (2007) Two-year results of intravitreal triamcinolone acetonide injection for the treatment of diabetic macular edema. *International Ophthalmology*. 27 (5), 299-306.
- Birngruber, R., Gabel, V.P. & Hillenkamp, F. (1977) -a- Fundus reflectometry: A step towards optimization of the retina photocoagulation. *Modern problems in ophthalmology*. 18, 383-90.
- Birngruber, R., Gabel, V.P. & Hillenkamp, F. (1977) -b- Fundusreflektometrie während der Laserkoagulation. *Sonderdruck aus Bericht über die 74. Zusammenkunft der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*. 422-427.
- Birngruber, R., Hillenkamp, F. & Gabel, V.P. (1985) Theoretical investigations of laser thermal retinal injury. *Health Physics*. 48 (6), 781-796.
- Birngruber, R. (1991) Choroidal circulation and heat convection at the fundus of the eye. In: Wolbarsht M., *Laser Applications in medicine and biology* (Vol. 5). New York. Plenum Press. 277-357.
- Brinkmann, R., Roider, J. & Birngruber, R. (2006) Selective retina therapy (SRT): A review on methods, techniques, preclinical and first clinical results. *Bulletin de la Société belge d'ophtalmologie*. 302 (302), 51-69.
- Brinkmann, R. & Birngruber, R. (2007) Selective Retina Therapy (SRT). *Zeitschrift für medizinische Physik*. 17 (1), 6-22.
- Brinkmann, R., Koinzer, S., Schlott, K., Ptaszynski, L., et al. (2012) Real-time temperature determination during retinal photocoagulation on patients. *Journal of biomedical optics*. 17 (6), 061219.
- Brown, D.M., Kaiser, P.K., Heier, J.S., et al. (2006) Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *The New England Journal of Medicine* 355 (14), 1432-1444.

- Denton, M.L., Noojin, G.D., Foltz, M.S., Clark, C.D., et al. (2011) Spatially correlated microthermography maps threshold temperature in laser-induced damage. *Journal of Biomedical Optics*. 16 (3), 036003.
- Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. A randomized trial comparing intravitreal triamcinolone acetonide and focal/ grid photocoagulation for diabetic macular edema (2008). *Ophthalmology* 115 (9), 1447-1459.
- Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. (2010). *Ophthalmology* 117 (6), 1064-1077.
- Dr. Claus von der Burchard, Unveröffentlichte Daten: Nachweisbarkeit von Läsionen, Temperaturschwellen Funduskopie, OCT, FLA. Persönliche Kommunikation (2016).
- Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group (1991). *Ophthalmology* 98 (5 Suppl.), 766-785.
- Figueira, J., Khan, J., Nunes, S., Sivaprasad, S., et al. (2009) Prospective randomised controlled trial comparing sub-threshold micropulse diode laser photocoagulation and conventional green laser for clinically significant diabetic macular oedema. *British Journal of Ophthalmology*. 93 (10), 1341-1344.
- Fong, D.S., Girach, A. & Boney, A. (2007) Visual side effects of successful scatter laser photocoagulation surgery for proliferative diabetic retinopathy: a literature review. *Retina (Philadelphia, Pa.)*. 27 (7), 816-824.
- Framme, C., Roider, J., Brinkmann, R., Birngruber, R., et al. (2008) Basic principles and clinical application of retinal laser therapy/ Grundlagen und klinische Anwendung der Lasertherapie an der Netzhaut. *Klinische Monatsblätter Für Augenheilkunde*. 225 (4), 259-268.
- Inderfurth, J., Ferguson, R.D., Puliafito, C.A., Frish, M.B., et al. (1995) Reflection measurement during retinal laser coagulation in patients. Development of an automatically controlled dosimeter. *Der Ophthalmologe: Zeitschrift Der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*. 92 (5), 717-722.
- Ip, M. & Puliafito, C.A. (2009) Laser Photocoagulation. In: Yanoff, M., Duker, J.S. (Hg.), *Ophthalmology*. 3. Edition, Mosby, 2008, 522- 523.
- Jerath, M.R., Chundru, R., Barrett, S.F., Rylander, H.G., et al. (1993) Reflectance feedback control of photocoagulation in vivo. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*. 111 (4), 531-534.
- Joussen, U.-P.D. med A.M. (2012) Pathologie, Klinik und Behandlung von diabetischen retinalen Gefäßerkrankungen. In: *Retinale Gefäßerkrankungen*. Springer Berlin Heidelberg. 99-162.

- Kandulla, J., Elsner, H., Birngruber, R. & Brinkmann, R. (2006) Noninvasive optoacoustic online retinal temperature determination during continuous-wave laser irradiation. *Journal of Biomedical Optics*. 11 (4), 041111.
- Koinzer, S., Elsner, H., Klatt, C., Pörksen, E., et al. (2008) Selective retina therapy (SRT) of chronic subfoveal fluid after surgery of rhegmatogenous retinal detachment: three case reports. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 246 (10), 1373-1378.
- Koinzer, S., Schlott, K., Portz, L., Ptaszynski, L., et al. (2012) Correlation of temperature rise and optical coherence tomography characteristics in patient retinal photocoagulation. *Journal of Biophotonics*. 5 (11-12), 889-902.
- Koinzer, S., Schlott, K., Ptaszynski, L., Bever, M., et al. (2012) Temperature- controlled retinal photocoagulation – A step toward automated laser treatment. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 53 (7), 3605-3614.
- Koinzer, S., Saeger, M., Schlott, K., Baade, A., et al. (2013) Automatische Effektsteuerung für minimal-invasive retinale Photokoagulation. In: *Seitz, B. Spitzenforschung in der Ophthalmologie, 111. DOG- Kongress*, Berlin. ALPHA Informationsgesellschaft mbH, Lampertheim. 146-150.
- Kozak, I., Oster, S.F., Cortes, M.A., Dowell, D., et al. (2011) Clinical evaluation and treatment accuracy in diabetic macular edema using navigated laser photocoagulator NAVILAS. *Ophthalmology*. 118 (6), 1119-1124.
- Lavinsky, D., Cardillo, J.A., Melo, L.A.S., Dare, A., et al. (2011) Randomized clinical trial evaluating mETDRS versus normal or high-density micropulse photocoagulation for diabetic macular edema. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 52 (7), 4314-4323.
- Lavinsky, D., Cardillo, J.A., Mandel, Y., Huie, P., et al. (2013) Restoration of retinal morphology and residual scarring after photocoagulation. *Acta ophthalmologica*. 91 (4), 315-323.
- Lavinsky, D. & Palanker, D. (2015) Nondamaging photothermal therapy for the retina. *Retina*. 35 (2), 213-22.
- Little, H.L., Zweng, H.C., Peabody, R.R. (1970) Argon laser slit-lamp retinal photocoagulation. *Transaction - American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*. 74 (1), 85-97.
- Luttrull, J.K., Musch, D.C. & Spink, C.A. (2008) Subthreshold diode micropulse panretinal photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy. *Eye (London, England)*. 22 (5), 607-612.
- Maswadi, S.M., Dodd, S.J., Gao, J.H., Glickman, R.D. (2004) Temperature mapping of laser-induced hyperthermia in an ocular phantom using magnetic resonance thermography. *Journal of Biomedical Optics* 9 (4), 711-718.

- Meyer-Schwickerath, G. (1967) History and development of photocoagulation. *American journal of ophthalmology*. 63 (6), 1812-1814.
- Natural history and clinical management of central retinal vein occlusion. The Central Vein Occlusion Study Group (1997). *Archives of Ophthalmology* 115 (4), 486-491.
- Oberholzer, M. (1983) *Morphometrie in der klinischen Pathologie: Allgemeine Grundlagen*. Berlin u.a.: 1. Edition, Springer-Verlag, 1983.
- Ogata, N., Ando, A., Uyama, M. & Matsumura, M. (2001) Expression of cytokines and transcription factors in photocoagulated human retinal pigment epithelial cells. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 239 (2), 87-95.
- Palanker, D., Lavinsky, D., Blumenkranz, M.S. & Marcellino, G. (2011) The impact of pulse duration and burn grade on size of retinal photocoagulation lesion: implications for pattern density. *Retina (Philadelphia, Pa.)*. 31 (8), 1664-1669.
- Palanker, D. (2016) Evolution of Concepts and Technologies in Ophthalmic Laser Therapy. *Annual Review of Vision Science*. 2, 295-319.
- Parver, L.M., Auker, C.R., Carpenter, D.O. (1982) The stabilizing effect of the choroidal circulation on the temperature environment of the macula. *Retina (Philadelphia, Pa.)*. 2, 117-120.
- Paulus, Y.M., Jain, A., Gariano, R.F., Stanzel, B.V., et al. (2008) Healing of retinal photocoagulation lesions. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 49 (12), 5540- 5545.
- Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy: the second report of diabetic retinopathy study findings (1978). *Ophthalmology* 85 (1), 82-106.
- Pomerantzeff, O., Wang, G.J., Pankratov, M. & Schneider, J. (1983) A method to predetermine the correct photocoagulation dosage. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*. 101 (6), 949-953.
- Preliminary report on effects of photocoagulation therapy. The Diabetic Retinopathy Study Research Group (1976). *American Journal of Ophthalmology* 81 (4), 383-396.
- Roider, J., Brinkmann, R., Wirbelauer, C., Laqua, H., et al. (1999) Retinal sparing by selective retinal pigment epithelial photocoagulation. *Archives of Ophthalmology*. 117 (8), 1028-1034.
- Roider, J., Brinkmann, R., Wirbelauer, C., Laqua, H., et al. (2000) Subthreshold (retinal pigment epithelium) photocoagulation in macular diseases: a pilot study. *British Journal of Ophthalmology*. 84 (1), 40- 47.
- Roider, J. (2001) Chirurgie mit thermischen Lasern. In: *Augenärztliche Therapie*. Kampik, A., Grehn, F. (Hg.), Stuttgart u.a.: 1. Edition, Georg Thieme Verlag, 2001, 125-142.

- Roider, J., Liew, S.H.M., Klatt, C., Elsner, H., et al. (2010) Selective retina therapy (SRT) for clinically significant diabetic macular edema. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 248 (9), 1263-1272.
- Rosenfeld, P.J., Brown, D.M., Heier, J.S., et al. (2006) Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England Journal of Medicine* 355 (14), 1419-1431.
- Saeger, M., Heckmann, J., Purtskhvanidze, K., Caliebe, A., et al. (2016) Variability of panretinal photocoagulation lesions across physicians and patients. Quantification of diameter and intensity variation. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 254, 1-11.
- Schlott, K., Koinzer, S., Ptaszynski, L., Bever, M., et al. (2012) Automatic temperature controlled retinal photocoagulation. *Journal of biomedical optics*. 17 (6), 061223.
- Shah, A.M., Bressler, N.M. & Jampol, L.M. (2011) Does laser still have a role in the management of retinal vascular and neovascular diseases? *American Journal of Ophthalmology*. 152 (3), 332-339.
- Sramek, C., Paulus, Y., Nomoto, H., Huie, P., et al. (2009) Dynamics of retinal photocoagulation and rupture. *Journal of biomedical optics*. 14 (3), 034007.
- Sramek, C., Mackanos, M., Spitler, R., Leung, L.-S., et al. (2011) Non-damaging retinal phototherapy: dynamic range of heat shock protein expression. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 52 (3), 1780-1787.
- Staurengi, G., Sadda, S., Chakravarthy, U., Spaide, R. (2014) Proposed lexicon for anatomic landmarks in normal posterior segment spectral- domain optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 121, 1572-1578.
- Stefánsson, E. (2006) Ocular oxygenation and the treatment of diabetic retinopathy. *Survey of Ophthalmology*. 51 (4), 364-380.
- Stellungnahme der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, der Retinologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands zur Therapie der diabetischen Makulopathie. DOG (2009) 1-38.
- Velez-Montoya, R., Guerrero-Naranjo, J.L., Gonzalez-Mijares, C.C., Fromow-Guerra, J., et al. (2010) Pattern scan laser photocoagulation: safety and complications, experience after 1301 consecutive cases. *British Journal of Ophthalmology*. 94 (6), 720-724.
- Weinberg, W., Gabel, V.-P., Birngruber, R., Lorenz, B., et al. (1981) Die zeitliche Entwicklung der Weißfärbung in Korrelation zur Schadensausdehnung bei der Photokoagulation der Netzhaut. In: Jaeger, W. *Uveitis*. Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft, Bericht über die 78. Zusammenkunft in Kiel 1980. J.F. Bergmann-Verlag. 603-606.
- Weinberg, W., Lorenz, B., Birngruber, R., Gabel, V.-P. (1982) Automatisch dosierte Photokoagulation zur Erzielung reproduzierbarer Effekte am Augenhintergrund. *Fortschritte der Ophthalmologie* 79 (2): 155-158.

7. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Chronologisches Verzeichnis der Publikationen, deren wesentliche Ergebnisse in die Dissertation eingeflossen sind. Im Fließtext wird auf die hier aufgeführten und mit römischen Ziffern versehenen Arbeiten hingewiesen. Die Kopien der Originalarbeiten befinden sich im Anhang.

- I. Koinzer, S., Saeger, M., Hesse, C., Portz, L., Kleemann, S., Schlott, K., Brinkmann, R., Roider, J. (2013) Correlation with OCT and histology of photocoagulation lesions in patients and rabbits. *Acta ophthalmologica*. 91 (8), 603-611.
- II. Koinzer, S., Hesse, C., Caliebe, A., Baade, A., Brinkmann, R., Roider, J. (2013) Photocoagulation in Rabbits: Optical Coherence Tomographic Lesion Classification, Wound Healing Reaction, and Retinal Temperatures *Lasers in Surgery & Medicine*. 45 (7), 427-436.
- III. Koinzer, S., Bajorat, S., Hesse, C., Caliebe, A., Kleemann, S., Bever, M., Brinkmann, R., Roeken, Ch., Roider, J. (2014) Calibration of histological retina specimens after fixation in Margo's solution and paraffin embedding to in-vivo dimensions, using photography and optical coherence tomography. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 252 (1), 145-153.
- IV. Koinzer, S., Baade, A., Schlott, K., Hesse, C., Caliebe, A., Brinkmann, R., Roider, J. (2015) Temperature- controlled retinal photocoagulation reliably generates uniform subvisible, mild or moderate lesions. *Translational vision science & technology*. 4 (5) 9.

Darüberhinausgehende Publikationen, Vorträge und Poster, in welche Daten dieser Studie einfließen. Die drei erstgenannten Arbeiten werden im Anhang geführt.

Hesse, C., Koinzer, S., Baade, A., Schlott, K., Caliebe, A., Saeger, M., Brinkmann, R., Roider, J. (2013) Optical coherence tomographic and temperature endpoints for rabbit retinal photocoagulation. *ARVO 2013*. Seattle, USA.

Koinzer, S., Hesse, C., Baade, A., Schlott, K., Caliebe, A., Saeger, M., Brinkmann, R., Roider, J. (2013) Automatic temperature controlled retinal photocoagulation facilitates four predictable lesion strenghts including sub-threshold lesions. *ARVO 2013*. Seattle, USA.

Koinzer, S., Hesse, C., Caliebe, A., Baade, A., Brinkmann, R., Roider, J. (2014) Photokoagulation - eine überholte Therapie? *Der Augenspiegel* 12/2014, 26-30.

- Hesse, C., Koinzer, S., Kleemann, S., Portz, L., Baade, A., Schlott, K., Saeger, M., Brinkmann, R., Roider, J. (2012) OCT- Analyse automatisch kontrollierter Laserphoto-koagulationläsionen. *Doktorandenseminar - Klinik für Ophthalmologie*. UKSH Kiel.
- Koinzer, S., Schlott, K., Baade, A., Hesse, C., Saeger, M., Ptaszynski, L., Bever, M., Brinkmann, R., Roider, J. (2012) Temperaturkontrollierte Photokoagulation zur automatischen Erzeugung gleichmäßiger Läsionen vorwählbarer Stärke. *DOG, Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft*. Kongress Berlin.
- Koinzer, S., Schlott, K., Portz, L., Hesse, C., Kleemann, S., Kielhorn, N., Baade, A., Saeger, M., Denner, R., Ptaszynski, L., Bever, M., Birngruber, R., Roider, J. (2012) Ganz schön verzogen - Dimensionsänderung der Netzhaut im Paraffinschnitt. *40. Jahrestagung der Deutschsprachigen Ophthalmopathologen*. Erlangen.
- Koinzer, S., Schlott, K., Portz, L., Hesse, C., Kleemann, S., Kielhorn, N., Baade, A., Saeger, M., Denner, R., Ptaszynski, L., Bever, M., Birngruber, R., Brinkmann, R., Roider, J. (2012) Ophthalmoskopisch unterschwellige Photokoagulationen auf OCT Endpunkt durch automatische Temperaturkontrolle der Läsionen. *25. Jahrestagung der retinologischen Gesellschaft*. Münster.
- Koinzer, S., Otto, M., Hesse, C., Caliebe, A., Saeger, M., Schlott, K., Baade, A., Brinkmann, R., Roider, J. (2013) Temperaturabhängige Veränderungen nach retinaler Photokoagulation am Kaninchen. *DOG, Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft, Kongress*. Berlin.
- Koinzer, S., Otto, M., Hesse, C., Saeger, M., Caliebe, A., Roider, J. (2013) Choroidale Veränderungen nach retinaler Photokoagulation. *63. Jahrestagung der Vereinigung norddeutscher Augenärzte*. Sylt.
- Koinzer, S., Otto, M., Hesse, C., Saeger, M., Caliebe, A., Roider, J. (2016) Descriptive study of choroidal effects underneath retinal photocoagulation lesions by optical coherence tomography - a rabbit study. *ARVO 2016*. Seattle, USA.

9. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei allen, die mich beim Zustandekommen dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Johann Roider, Direktor der Klinik für Ophthalmologie am UKSH, Campus Kiel, meinem Doktorvater, danke ich für die Überlassung dieser Arbeit und den damit verbundenen Erfahrungen in wissenschaftlicher Praxis. Und ich danke für die Möglichkeit zur Teilhabe an der ARVO in Seattle, USA 2013.

Herrn PD Dr. Stefan Koinzer, meinem wissenschaftlichen Betreuer, danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit, geprägt von Freundlichkeit und Humor, aber auch von Präzision und Effektivität. Darüber hinaus bedanke ich mich für den guten Espresso, sowie jedes einzelne Stück Schokolade!

Besonderer Dank für die Interpretation meiner Datenflut und für die kompetente statistische Beratung geht an Frau Dr. Amke Caliebe.

Darüber hinaus möchte ich den Kooperationspartnern am MLL und BMO in Lübeck und der Firma Carl Zeiss Meditec AG meinen Dank aussprechen, sowie den Mitarbeitern der Augenklinik am UKSH- Kiel.

Allen anderen voran, bedanke ich mich bei meiner Mutter, Christine Hesse, für all ihre Liebe, ihre Geduld und ihre Zuversicht. Sie hat alle Höhen und Tiefen miterlebt und sich über jeden Schritt vorwärts mindestens genauso sehr gefreut wie ich!

Ebenso sende ich liebe Gedanken an meine kleine Familie, Dr. Ingeborg Hesse-Nowak und Dr. Normann Hesse, die aus eigener Erfahrung heraus mitfieberten.

Treue Weggefährten, die mich begleitet haben, sind Little Kansas Chief & Domino Day - sie trugen mich auf ihren Rücken durch die Zeit.

10. ANHANG

10.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
BM	Bruch'sche Membran
BRS	Blut- Retina- Schranke
BVOS	„Branch Vein Occlusion Study Group“
CHO	Choroidea = Aderhaut
CNV	Choroidale Neovaskularisation
CVOS	„Central Vein Occlusion Study Group“
CW	Continuous Wave- Modus = Dauerstrich des Lasers
ED 95	Effektdosis 95 = bei 95% der Individuen tritt der gewünschte Effekt auf
EDTRS	„Early Treatment Diabetic Retinopathy Study“
ELM	Membrana limitans externa
EZ	Ellipsoide Zone, ehemals: IS- OS- Junction Line
FLA	Fluoreszenzangiographie
Fd	Fundus
GIMP	GNU Image Manipulation Program = Bildbearbeitungsprogramm
GL	Ganglion Cell Layer = Ganglienzellschicht
GLD	Greatest Linear Diameter = Größter linearer Durchmesser
Hd x	Herd Nummer x
HUGIN	Stitching- Software für Panoramabilder
HSP70	Hitzeschockprotein 70 (bei Induktion der zellulären Immunantwort)
ImageJ	Bildbearbeitungs- und -verarbeitungsprogramm
INL	Inner Nuclear Layer = Innere Körnerschicht
IPL	Inner Plexiform Layer = Innere plexiforme Schicht
IQR	Interquartilen Range
IR	Infrarot
IS	Inner Segment = Innenliegendes Außensegment der Photorezeptorzellen
IS- OS- Junction Line	= Inner Segment- Outer Segment- Junction Line = Trennlinie zwischen inneren und äußeren Segmenten der Photorezeptoraußensegmente, akt. Nomenklatur: Ellipsoide Zone
LA/ RA	Linkes Auge/ Rechtes Auge
OCT	Optical Coherence Tomography = Optische Kohärenztomographie
OCT GLD	Läsionsdurchmesser in der OCT, gemessen zwei Stunden nach Applikation
ONL	Outer Nuclear Layer = Äußere Körnerschicht
OPL	Outer Plexiform Layer = Äußere plexiforme Schicht
OS	Outer Segment = Außenliegendes Außensegment der Photorezeptorzellen
PASCAL	PATtern-SCAnning-Laser
PS	Photorezeptoraußensegmente, unterteilbar in: IS = mitochondrienreiche Innensegmente OS =membranscheibchenhaltige Außensegmente
RCS	Retinopathia centralis serosa

ROP	Retinopathy of Prematurity = Retinopathia praematurorum = Frühgeborenenretinopathie
RPE	Retinales Pigmentepithel
SPSS®	Statistical Package for the Social Sciences = Statistik- und Analysesoftware
SRT	Selektive Retinatherapie
TTC	Time-Temperature-Characteristic-lesion
TTT	Transpupilläre Thermotherapie
VEGF	Vascular endothelial Growth Factor

10.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	S. 6	Schadensintegral nach Arrhenius
Abb. 2	S. 7	Adaptierte Arrheniuskurve
Abb. 3	S. 9	Schema Behandlungssetting
Abb. 4	S. 10	Schematische Darstellung des behandelten Auges
Abb. 5	S. 1	Entstehung optoakustischer Daten
Abb. 6	S. 12	Setting Tierversuch
Abb. 7	S. 13	Panoramaaufnahme linkes Auge (LA) des Kaninchens „Lola“
Abb. 8	S. 14	Begleiterscheinungen an einer Läsion nach Photokoagulation
Abb. 9	S. 15	Kalibrierkreuz
Abb. 10	S. 16	Identifikation und Export: Erklärung des Prinzips anhand einer Läsion
Abb. 11	S. 17	11 a) und b) Verlaufsdokumentation I und II
Abb. 12	S. 18	Auflösungen: OCT versus Histologie
Abb. 13	S. 19	Histiosynopse der Retina
Abb. 14	S. 21	Klassifikation der Herdintensitäten anhand der OCT- Morphologie
Abb. 15	S. 23	OCT- Schadensklassen: Läsionsdurchmesser Fundusfoto und OCT
Abb. 16	S. 24	OCT- Schadensklassen: Realleistung und Spitzenendtemperatur
Abb. 17	S. 25	OCT- Schadensklassen: Heilungsverlauf über drei Monate
Abb. 18	S. 26	Validitätskriterien in Abhängigkeit zur OCT- Schadensklasse
Abb. 19	S. 27	TTC- Läsionsgruppen: Sichtbarkeit Fundusfoto und OCT nach 2 Std.
Abb. 20	S. 28	TTC- Läsionsgruppen: Funduskopische Durchmesser und OCT GLD
Abb. 21	S. 29	Validitätskriterien in Abhängigkeit zur TTC- Läsionsgruppe
Abb. 22	S. 30	Verteilung OCT- Schadensklassen in Bezug zu TTC- Läsionsgruppen
Abb. 23	S. 45	Gegenüberstellung Histologie und OCT: Mensch versus Kaninchen

10.3 GENEHMIGUNG ZUR DURCHFÜHRUNG VON VERSUCHEN AN WIRBELTIEREN

Das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume, Kiel, erteilte am 07. April 2009 für Phase 1 im Rahmen des Versuchsvorhabens „Automatische, temperaturgeregelter Dosimetrie zur minimal invasiven Laser- Photokoagulation der Netzhaut“ unter dem Zeichen V 312-72241.121-11 die Genehmigung zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen. Diese Genehmigung wurde am 20. April 2011 für die Phase 2 der Versuche in ihrer Gültigkeit bis zum 30. April 2012 verlängert.

Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 7151 | 24171 Kiel

Herrn
Dr. Stefan Koinzer
Klinik für Augenheilkunde
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Kiel
Haus 25 – Arnold-Heller-Str. 3
24105 Kiel

Ihr Antrag vom: 20.01.2009

Mein Zeichen: V 312-72241.121-11 (10-2/09)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:

Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
Tierschutzbeauftragter der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Olshausenstraße 40
24098 Kiel

nachrichtlich:

Herrn Dr. R. Noël
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

7. April 2009

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Dr. Koinzer,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 18. Dezember 2007 (BGBl. I S. 3001), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Automatische, temperaturgeregelte Dosimetrie zur minimal
invasiven Laser-Photokoagulation der Netzhaut

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 38 Kaninchen verwendet werden.

2. Die Genehmigung ist bis zum 30. April 2011 befristet.
Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.
3. Leiter des Versuchsvorhabens:
Herr Dr. Stefan Koinzer
4. Sein Stellvertreter:
Herr Prof. Dr. Johann Roider
5. Wechselt der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
6. Verantwortlicher Tierarzt nach § 9 Abs. 2 Nr. 8 Tierschutzgesetz:
Herr Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
7. Weitere Nebenbestimmungen:
Die Genehmigung beschränkt sich zunächst auf die Phase 1 der Untersuchungen. Danach ist ein Zwischenbericht vorzulegen.

Die Bestimmungen der §§ 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 9 Abs. 1 Tierschutzgesetz genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Irmer

Dr. Irmer



Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Herrn
Dr. Stefan Koinzer
Klinik für Ophthalmologie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Kiel
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 25
24105 Kiel

Ihr Antrag vom: 16.03.2011

Mein Zeichen: V 312-72241.121-11 (10-2/09)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:

Herrn Dr. R. Noël
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

20. April 2011

Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken

Sehr geehrter Herr Dr. Koinzer,

aufgrund Ihres o. a. Antrages verlängere ich die Gültigkeitsdauer meiner Genehmigung vom 7. April 2009 für das Versuchsvorhaben „Automatische, temperaturgeregelte Dosimetrie zur minimal invasiven Laser-Photokoagulation der Netzhaut“ bis zum 30. April 2012.

Für die Phase 2 der Versuche dürfen weitere 27 Kaninchen eingesetzt werden.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Sekulla

Correlation with OCT and histology of photocoagulation lesions in patients and rabbits

Stefan Koinzer,¹ Mark Saeger,¹ Carola Hesse,¹ Lea Portz,¹ Susanne Kleemann,¹ Kerstin Schlott,² Ralf Brinkmann^{2,3} and Johann Roider¹

¹Department of Ophthalmology, University of Kiel, Kiel, Germany

²Institute of Biomedical Optics, University of Lübeck, Lübeck, Germany

³Medical Laser Center Lübeck GmbH, Lübeck, Germany

ABSTRACT.

Purpose: To examine spectral domain optical coherence tomographic (OCT) and histological images from comparable retinal photocoagulation lesions in rabbits, and to correlate these images with comparable OCT images from patients.

Methods: 508 rabbit lesions were examined by HE-stained paraffin histology. 1019 rabbit lesions versus 236 patient lesions were examined by OCT, all at the time-points 1 hr, 1 week and 4 weeks after photocoagulation. We analysed 100 μm lesions (in humans) and 133 μm lesions (in rabbits) of 200 ms exposures at powers titrated from the histological threshold up to intense damage. Lesions were matched according to morphological criteria.

Results: Dome-shaped layer alterations, retinal infiltration by round, pigmented cells, outer nuclear layer interruption, and eventually full thickness retinal coagulation are detectable in histology and OCT. Horizontal damage extensions are found 1½ times larger in OCT. More intense irradiation was necessary to induce comparable layer affection in rabbit OCT as in histology. Restoration of the inner retinal layers is only shown in the OCT images. Comparable primary lesions caused more pronounced OCT changes in patients than in rabbits during healing.

Conclusions: Optical coherence tomographic images indicate different tissue changes than histologic images. After photocoagulation, they show wider horizontal damage diameters, but underestimate axial damage particularly during healing. Conclusions on retinal restoration should not be drawn from OCT findings alone. Retinal recovery after comparable initial lesions appears to be more complete in rabbit than in patient OCTs.

Key words: histology – laser – optical coherence tomography – photocoagulation – retina – retinal healing

Introduction

Optical coherence tomography (OCT) has become one of the highest resolution *in vivo* imaging tools since its clinical introduction in the early 1990s (Huang et al. 1991) and is indispensable to modern ophthalmology. Its spatial resolution in the order of few microns (Kiernan et al. 2010) has led some authors to equalize it with ‘*in vivo* microscopy’ (Kang et al. 2010). However, there are principal differences between images from OCT and histology, apart from spatial resolution.

Optical coherence tomographic imaging relies on optical scattering properties of a tissue, detecting strong signals from light-scattering layers and reflective interfaces, which are commonly displayed by increasing shades of grey. OCT can be performed *in vivo* on patients and is noninvasive and nondamaging, facilitating repeated examinations of identical structures. Its availability is nearly unlimited for physiological and pathological conditions as well, and it rules out any fixation artefacts. In histological specimens, in contrast, visualization relies on chemical affinities of tissue molecules to stains, most prominently haematoxylin and eosin. Staining allows to localize a vast variety of proteins and nucleic acids.

While the OCT to histologic correlation with healthy tissue, particularly retina, is well described (Srinivasan et al. 2008; Spaide & Curcio 2011), direct correlation with pathologic conditions as displayed in OCT and histology is scarce (such as Kim et al. 2012). Photocoagulation allows to apply fairly defined and reproducible wounds to the retina and is therefore particularly suitable for such a correlation. Since an early contribution in 1995 (Toth et al. 1995), OCT resolution has increased significantly, and photocoagulation has aimed at lower intensities (Dorin 2004). Thus, we conducted this study to compare up-to-date spectral domain OCT images from rabbits to rabbit histological images and to human OCT images. The study was primarily designed as a systematic qualitative image comparison, but evaluates some numerical data on lesion diameters as well, testing the hypothesis that photocoagulation lesions appear different in histology and OCT.

Materials and Methods

This study contained three arms that were conducted independently, and their results were afterwards compared. The first arm included four eyes of two rabbits that were each treated by three consecutive photocoagulation sessions 1 hr, 1 week and 4 weeks prior to histological workup. The second arm included six eyes of three rabbits that were treated by photocoagulation and imaged by OCT 1 hr, 1 week and 4 weeks after treatment. The third arm included 20 eyes of 20 patients that were examined by OCT, again 1 hr, 1 week and 4 weeks after photocoagulation. In all study arms, lesion powers were titrated to produce ophthalmoscopically invisible lesions and then increased stepwise until they produced intense lesions with a necrotic core, but no bleedings or ruptures. In the afterwards comparison, lesions of all three arms were matched by their appearance in histology or OCT, respectively.

Animal photocoagulation experiments

We performed photocoagulation on chinchilla grey rabbits. The race was chosen because of its large size and its particularly homogenous fundus pigmentation. The animals were treated

under general and local anaesthesia, with dilated pupils. A modified Mainster focal grid laser contact lens was fitted onto the eye with methylcellulose gel (2%) and mechanically fixed in its position. We performed photocoagulation with a modified 532 nm continuous wave (CW) laser system (based on a VISULAS VITE, Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany) and measured the laser power output externally. The irradiation diameter was 200 μm in air and 133 μm on the fundus due to a 33% optical demagnification. We intended to get as close as possible to 100 μm diameter with the preset diameter selections of the laser device. Exposure times were 200 ms or, for threshold and weak lesions, variable (Koinzer et al. 2012b; Schlott et al. 2012).

The rabbits were maintained in animal units at the University Medical Centre of Schleswig-Holstein, and all animal experiments were performed according to the German law for protection of animals and approved by the Ministry of Agriculture, the Environment and Rural Areas of Schleswig-Holstein, Kiel, Germany (application no. V312-7234.121-11).

Histological workup

We analysed photocoagulation lesions histologically from four eyes of two rabbits that had received three consecutive photocoagulation treatments 4 weeks, 1 week and 1 hr prior to their death. After enucleation, we fixated the eyes overnight in Margo's solution (1% buffered formaldehyde and 1.25% glutaraldehyde). The area of interest was cut out of a retina-choroid-sclera preparation, marked with colour, dehydrated in increasing isopropanol concentrations, embedded in paraffin, cut it in 5 μm slices at 50 μm distance and stained with haematoxylin and eosin. Intense photocoagulation lesions, colour marks, the optic nerve and the spatial relation of lesions were used to identify laser lesions within the specimens. We localized 145 lesions after 1 hr, 184 lesions after 1 week and 179 lesions after 4 weeks. One hundred and thirty-seven of 645 lesions could not be detected because they were either sub-threshold, had completely healed or due to tissue destruction after workup.

Patient study

236 laser lesions were examined by fundus photography and OCT in 20 eyes from 20 patients. The study was reviewed and approved by the institutional ethics committee at Kiel University (application no. A 105/10) and was carried out in accordance with the contents of the declaration of Helsinki. All data were recorded during routine treatment. Treatments (16/20 diabetic retinopathy, 4/20 diabetic maculopathy, 3/20 vein occlusion, 1/20 occlusive vasculitis) followed the treatment guidelines of the German ophthalmological society that were valid at the time of treatment (Hoe- rauf et al. 2010; Ziemssen et al. 2010).

We treated with a 532 nm CW photocoagulator (VISULAS VITE, Carl Zeiss Meditec AG). The irradiation diameter was 100 μm , exposure times were 20, 50, 100 or 200 ms. Study lesions were placed in a suitable area outside the temporal vessel arcades or nasally to the optic disc. Further details on the study design have been published in Koinzer et al. (2012a).

Lesion imaging

We obtained fundus colour photographs of all lesions 1 hr, 1 week (day 5–8 in patients) and 4 weeks (day 22–30 in patients) after the treatment session. For patients, we used a Zeiss FF450 plus fundus camera, and for rabbits a Zeiss VISUCAM (both Carl Zeiss Meditec AG). All study lesions were individualized by mapping them on fundus images, and technical parameters were recorded for each lesion.

Optical coherence tomography series were acquired at the same time-points as fundus colour images. We scanned the treated area in 30 μm steps using a spectral domain OCT (HRA + OCT Spectralis®, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). Every sectional image was obtained by averaging of 20 sweeps to optimize image quality. If a lesion could be identified, we traced it through the consecutive series of OCT images using the AutoRescan™ function.

Qualitative lesion matching

To assess general differences in rabbit and patient OCT and histological

images of the retina, we compared images from healthy retinal sections (Fig. 1). The specimen of human retina from the posterior pole in Fig. 1 was obtained from our histological archive, and the human OCT from one investigator (SK).

To examine photocoagulation lesions, the following digital processing was undertaken with the correlated images: OCT images were horizontally stretched fourfold (Fig. 2) and upsampled 1.5-fold. The resulting images were comparable to the '1:1 μm ' display mode in the OCT software but had a higher resolution than digitally exported '1:1 μm ' images. Histological photographs displayed were taken with 200-fold magnification. If the RPE was not dissected horizontally, we cropped images to align it.

In order to judge lesion intensities qualitatively, we considered the imaging results of five groups of lesions separately: Rabbit histological specimens after 1 hr (group, $n = 145$), after 1 week (group 2, $n = 184$) or

4 weeks (group 3, $n = 179$), OCT images of rabbit lesions (group 4, $n = 1019$), or OCT images of patient lesions (group 5, $n = 236$). Only histological or OCT images, respectively, were used for the consideration, while the ophthalmoscopic lesion appearance was not regarded for qualitative analysis, but in the statistical evaluation. Within all five groups, we arranged lesions according to their intensity, picked representative examples and put them together in composites for the following intensities:

We compared the softest (Fig. 3B, 'threshold lesions') and the strongest (Fig. 3G, 'strongest lesions') morphological damages that we found in all image modalities. Additionally, we took lesion intensities slightly above threshold (Fig. 3C, 'weak lesions') or slightly below the strongest intensity (Fig. 3F, 'strong lesions') for comparison, and we compared a medium intensity lesion type (Fig. 3E). Another category where a localized RPE detachment occurred was also compared (Fig. 3D, 'RPE bleb'

lesions). The increasing intensity of the lesion groups was evaluated by comparison of the 1 week- and 4 week-changes as well.

Lesion size measurements

Lesion diameters were assessed on images or specimens, respectively, that had been obtained after 1 hr. Only lesions that were detectable in the according imaging method were included in the evaluation.

In colour fundus photographs, oedematous halos were excluded from the spot size measurements. The size of study lesions was assessed manually by three independent observers. They outlined every lesion, measured the pixel size of the lesion and calculated the pixel and real diameters. Out-of-range values were excluded and the mean value was considered to be the spot size (as described in Koinzer et al. 2012b).

For OCT lesion diameter measurements, we used the '1:1 μm ' and 800% OCT image display mode to measure the greatest linear diameter (GLD) of a lesion at the inner segment (IS)–outer segment (OS) junction line, or, in threshold OCT lesions, at the external limiting membrane (ELM) to outer nuclear layer (ONL) transition.

On histology slides, we measured GLD's on digital slide images. In order to quantify horizontal tissue distortion through the histological workup procedure, we compared 51 distances of equal lesion pairs on fundus images and histological slides from all four rabbit eyes.

Statistical analyses

The statistical analyses of lesion diameters were carried out by simple linear regression. We calculated linear regression coefficients, linear equations and statistical significances in spss software, version 20. p-values below 0.05 were considered significant.

Results

Comparison of healthy retina in human and rabbit OCT and histology

Figure 1 compares paraffin histology and OCT from human retina with

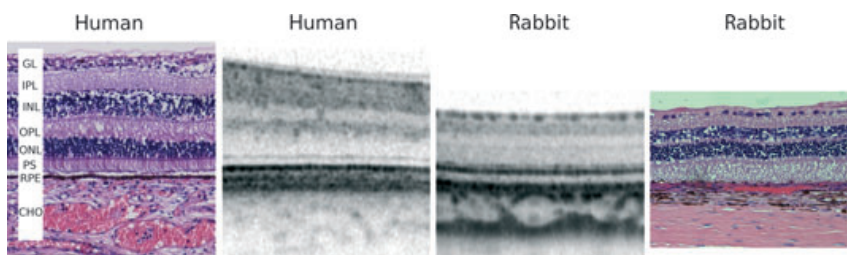


Fig. 1. From left to right: direct comparison of paraffin histology (HE-staining, x200) and OCT from human retina, OCT and histology from rabbit retina. The retinal pigment epithelium is aligned in all images, and all images were stretched for comparable axial scales. The layer legend indicates the choroid (CHO), retinal pigment epithelium (RPE), photoreceptor segments (PS), outer nuclear layer (ONL), outer plexiform layer (OPL), the inner nuclear layer (INL), the inner plexiform layer (IPL) and the ganglion cell and nerve fibre layer (GL).

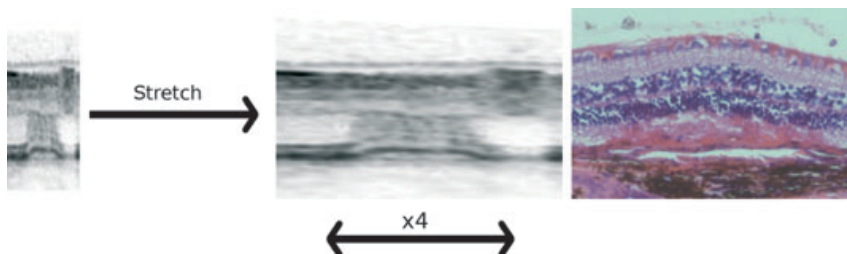


Fig. 2. OCT axial resolution is 4 times greater than its lateral resolution, leading to axially stretched OCT images ('1:1 pixel' mode in the OCT software, which is most commonly used, left image). To facilitate direct visual analogy to histological specimens (image on the right), image scaling is advisable. As indicated by the arrows, we stretched all OCT images in this paper (except Fig. 1) horizontally and adapted them to histological images (equal x and y scales). The built-in '1:1 μm ' depiction of the OCT device creates such images as well, but reduces image resolution in the file export.

(A)

Histology rabbit 1 h post	Histology rabbit 1 week post	Histology rabbit 1 month post
OCT rabbit 1 h post	OCT rabbit 1 week post	OCT rabbit 1 month post
OCT human 1 h post	OCT human 1 week post	OCT human 1 month post

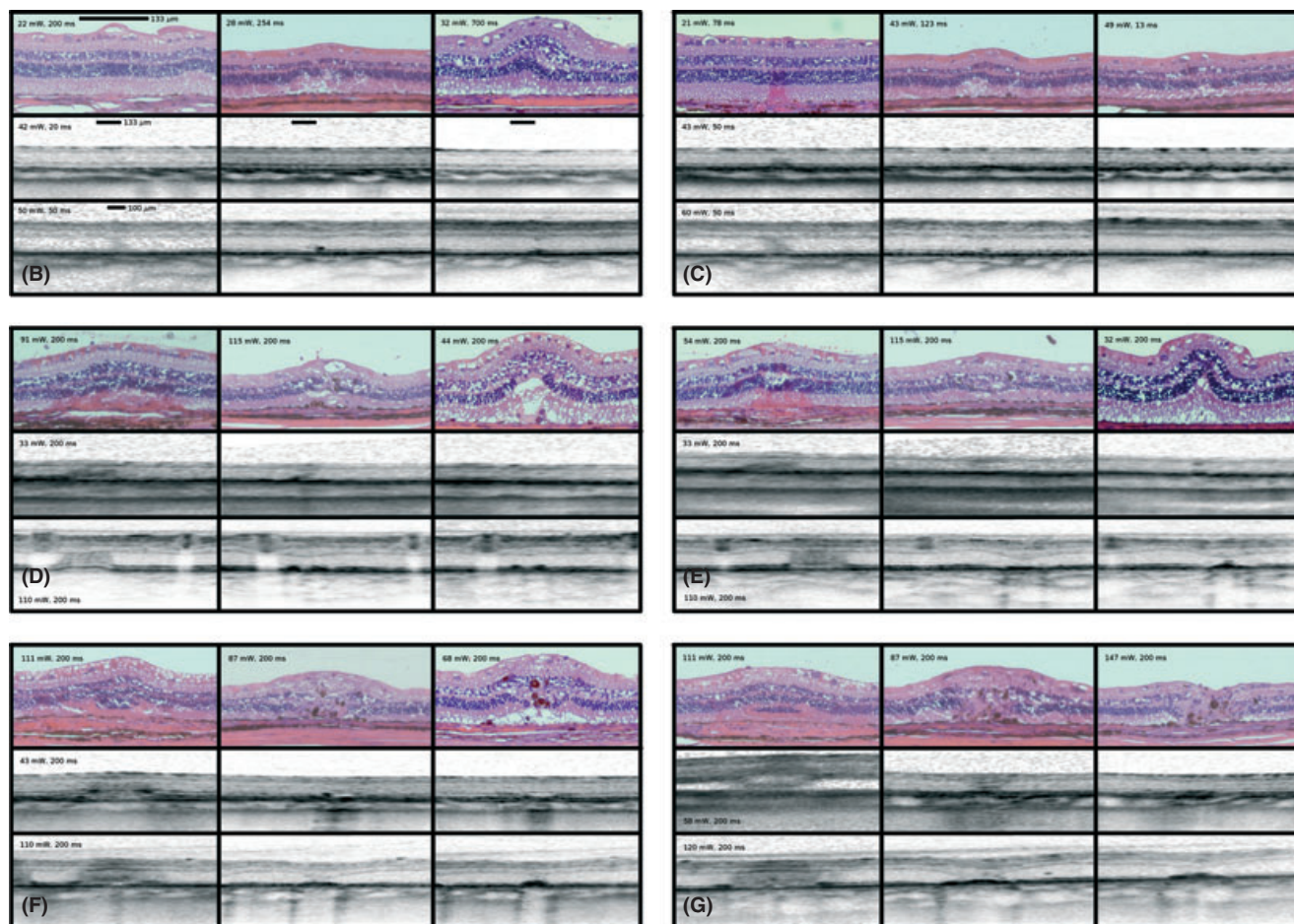


Fig. 3. Composites presenting six classes of lesion intensities, directly comparing findings from rabbit histology (top row) to rabbit OCT (middle row) and human OCT (lower row) at three different time-points: 1 hr post-treatment (left column), 1 week post-treatment (middle column) and 1 month post-treatment (right column), as shown in (A). (B–G) show composites of increasing lesion intensities that we labelled as follows: (B) threshold lesion, (C) weak lesion, (D) lesion with sub-RPE bleb, (E) medium intensity lesion, (F) strong lesion and (G) strongest lesion. For a detailed comparative lesion description, please refer to the main text. Black scale bars in (B) are representative for all composites and indicate the laser irradiation diameter, which was 133 μm in rabbits and 100 μm in patients. The demagnifying optics of rabbit eyes did not allow to use exactly the same irradiation diameter in rabbits and patients. Different scales in histological and OCT displays are due to the larger lesion diameters in OCT images (see also Fig. 4). The parameters power and exposure time are shown for each lesion. Only one set of values is given for OCT lesions, because all images show the same lesion at different time-points. Rabbit fundi were treated below and in symmetrical arrays nasally and temporally of the papilla. Human fundi were treated outside the temporal arcades. We preferably used 200 ms exposures. Because in weak and threshold lesions, the according intensities were not reliably achievable by 200 ms lesions, we used different, partly variable exposure times. It is obvious from the data that there is no reliable correlation with the power used to the morphological damage, which is due to pigment and transmission variations.

OCT and histology from rabbit retina. The retinal pigment epithelium is aligned in all images, and all images are stretched to the same axial scale.

Human retinal layers are depicted in the histological picture. A multi-layered ganglion cell layer (GL) indicates the origin of the human speci-

men from the posterior pole. The adjacent parafoveal horizontal human OCT section is 300 μm (left) to 250 μm (right) thick. It shows

essentially identical layers, but additional dark bands within the photoreceptor segment (PS) layer. The dark separation line of PS and ONL is the ELM. A dark band within the PS visualizes the IS-OS junction line (Srinivasan et al. 2008; Spaide & Curcio 2011). The outermost photoreceptor segment parts, retinal pigment epithelium (RPE) and Bruch's membrane (BM) underneath represent one dark complex in OCT.

The OCT and histological sections of rabbit retina were taken at the visual streak, where the retina is thickest, but free of myelin (190 μm in OCT, 130 μm in histology). The layering is identical to human retina, with thickness proportions shifted towards thinner layers above the ONL.

Detailed qualitative lesion correlation with different intensity lesions

Figure 3 displays a legend (Fig. 3A) and composites of six different lesion intensities (Fig. 3B–G). Scale bars in Fig. 3B depict the irradiation diameters and are representative for all composites. They also indicate the lesion location in threshold rabbit OCTs.

Lesions in each composite were matched by their morphology, not by treatment laser power. There is no reliable correlation with the power used to the morphological damage, which is due to pigment and transmission variations. While in OCT composites, we show the same lesion in all three images, histological images necessarily display three lesions of comparable intensity but different anatomical location.

The *threshold* histological lesions (Fig. 3B) show coagulation of the outermost OS and discrete ONL pyknosis and condensation, and after 1 week RPE cell swelling and ONL nuclei reduction, while after 1 month, there is a slight fibrotic reaction in the OPL. GL nuclei are intact. In rabbit OCT images, changes of the IS-OS junction line and the ELM are denoted first, while the first changes in human OCT are located in the ONL. In rabbit OCTs, the changes remain confined to subtle IS-OS-reflectivity changes subsequently, while in patient OCTs, there is a clear RPE reaction and thinning of the ONL. The inner retinal layers, INL and above, appear invariably intact. These threshold

lesions are mostly funduscopically invisible in patients (Bhatnagar et al. 2010; Koinzer et al. 2012a).

In *weak lesions* (Fig. 3C), the axial damage reaches the OPL in all images. RPE cells are absent in the histological wound after 1 hr, but enlarged pigmented cells have closed the layer after 1 week. In OCT images, the RPE appears irregular during the healing stage, which is more pronounced in patients. After a month, histological alterations reach the INL, while the rabbit OCT shows ELM interruption, but no damage above that. In this case, fine alterations of the inner retinal layers are underestimated and wound healing is overestimated in OCT images. In the patient OCT, the damage appears to be confined to the POS at the first glance, but interruption of the OPL and darkening of the inner ONL are also visible.

In the lesion type with an *RPE bleb* (Fig. 3D), 1 hr lesions reach the IPL, leaving the GL largely intact. Histological lesions are invaded by large, round pigmented cells later on. Rabbit histology and OCT indicate full thickness retinal affection after 1 week, while the patient OCT shows only IPL invagination after 1 week with questionable alteration of the inner layers. After 1 month, the specimen shows a fibrotic reaction up to the INL, while the damage does not exceed the ONL in rabbit and patient OCTs. Again, wound healing is overestimated in OCT images.

In the *medium intensity lesions* (Fig. 3E), similar changes appear more pronounced. The ONL is persistently interrupted even in OCT images, and the innermost retinal layers are affected throughout the composite. However, late changes of the inner retinal layers are subtle and may be easily missed in commonly scaled OCT images ('1:1 pixel'). In the specimen, in contrast, thinning of the GL and focal absence of GL nuclei are unequivocally detectable.

In *strong lesions* (Fig. 3F), the entire retina is altered in all 1 hr images and throughout the histological series. In contrast, persistent damage beyond the ELM is doubtful in the late rabbit OCT images. The true damage may be easily underestimated in OCT images. In patient OCTs, the ONL remains interrupted, but damage

above the OPL cannot be detected. Notably, on 1 hr OCT images, the bright INL seems to be continuous, although the adjacent IPL and GL appear darkened as a sign of coagulative damage.

The *strongest lesion* (Fig. 3G) shows surprisingly well-preserved retina in histology after 1 hr. A third nuclear layer appears underneath the ONL. The follow-up histologies show full thickness retinal scarring across Bruch's membrane. The 1 hr and 1 week OCT images show full thickness coagulation as well, and in contrast to the 'strong' lesion, even the INL is darkened. Layering appears intact above the ELM in rabbit OCTs after 1 month, which is obviously an overestimation of retinal wound healing. In the patient OCT, the ONL remains interrupted, but inner layer damage is questionable. The early rabbit OCT shows shallow exudative retinal detachment, which we have also observed in rabbit histology (not shown), but not in patient OCT. Here, overtreatment would rather cause choroidal effusion (Tinley & Gray 2009).

Statistical analysis of lesion diameters

Figure 4 shows linear regression analyses of ophthalmoscopic lesion diameters and OCT or histological GLD's, respectively. Black circles indicate correlated values of human lesion ophthalmoscopic diameters and OCT GLD's ($n = 134$, linear $R^2 = 0.613$, correlation best described by the linear equation $y = 42 + 1.508 * x$, where y is the OCT GLD and x is the ophthalmoscopic diameter). Light grey squares indicate correlated values of rabbit lesion ophthalmoscopic lesion diameters and OCT GLD's ($n = 274$, $R^2 = 0.587$, $y = 70 + 1.415 * x$), and dark grey triangles indicate correlated values of rabbit lesion ophthalmoscopic diameters and histological GLD's ($n = 46$, $R^2 = 0.726$, $y = -20 + 1.12 * x$, where y is the histological diameter). The R^2 values indicate close linear correlation, which was statistically significant for all three correlations shown ($p < 0.001$).

A very light grey line marks equal x and y values. The ophthalmoscopic-to-histological lesion diameter regression line runs close to this very light grey line, indicating that ophthalmoscopic

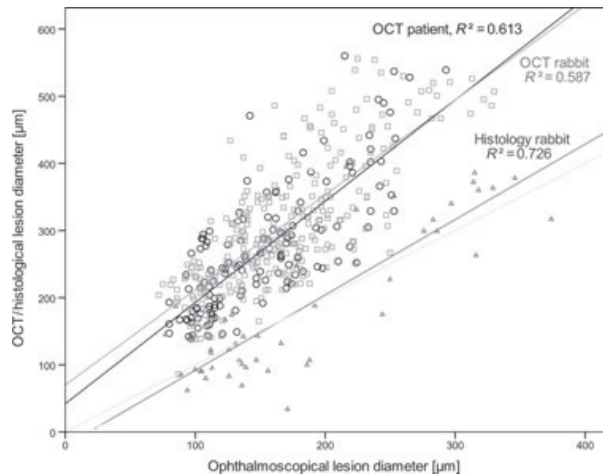


Fig. 4. Linear regression analyses of ophthalmoscopic lesion diameters and human OCT GLD's (black circles, $n = 134$, linear $R^2 = 0.613$, correlation best described by the linear equation $y = 42 + 1.508 * x$, where y is the OCT GLD and x is the ophthalmoscopic diameter), ophthalmoscopic lesion diameters and rabbit OCT GLD's (light grey squares, $n = 274$, $R^2 = 0.587$, $y = 70 + 1.415 * x$) or of ophthalmoscopic lesion diameters and histological GLD's (dark grey triangles, $n = 46$, $R^2 = 0.726$, $y = -20 + 1.12 * x$, where y is the histological diameter). All three correlations were statistically highly significant ($p < 0.001$). A very light grey line indicates equal x and y values. The irradiation diameter was $100 \mu\text{m}$ in patients and $133 \mu\text{m}$ in rabbits. All data were recorded 1 hr after the end of photocoagulation treatment, and only lesions that were detectable in the according imaging method were included in the evaluation.

and histological diameters are very similar. The complete set of linear regression lines of OCT GLD's or histological lesion diameters, respectively, at all timepoints (1 hr, 1 week and 4 weeks) over ophthalmoscopic lesion diameters is shown in the supplementary figure S1. We show the corresponding linear equations and R^2 values in the

supplementary table S1 as well. These data are consistent with our statements, but weaker than those presented in Fig. 4. Comparison of the linear constants and slopes of OCT GLD's over ophthalmoscopic diameter ($42/1.508$ and $70/1.415$) to those of histological GLD's over ophthalmoscopic diameter ($-20/1.12$) allows an estimation that

OCT GLD's are about $1\frac{1}{2}$ times larger than histological GLD's. The regression lines of human and rabbit OCTs are almost equal and indicate good measurement reliability.

Lesion distances ($n = 51$) were longer on histological slides than in fundus images by a factor of (1.17 ± 0.16), with good consistency among four rabbit eyes, which indicates 17% horizontal retinal stretching through the histological workup.

The most important results of our study are summarized in Table 1.

Discussion

This study presents a comparative analysis of photocoagulation lesions at time-points 1 hr, 1 week and 1 month after the treatment. 508 rabbit lesions were examined histologically, and 1019 rabbit lesions versus 236 patient lesions by OCT. We used the best clinically available OCT image quality (Kiernan et al. 2010). Major structural alterations are visible on both histological and OCT images, but weak layer alterations were underestimated and wound healing was overestimated in OCT. Moreover, the lateral extension of a lesion is displayed significantly wider in OCT.

In order to induce comparable lesions, we kept exposure times (mostly 200 ms) and diameters (approximately $100 \mu\text{m}$) between groups as similar as possible. Power was titrated to induce any possible lesion intensity from invisible up to very intense, but we avoided retinal ruptures or choroidal bleedings. Ruptured retinal lesions, which induced choroidal neovascularization, have been investigated in mice by Hoerster et al. (2012). They discuss the topic with an emphasis on OCT versus fluorescein angiography, but they do show OCT and histology. Others have investigated retinal degenerations in mice and rats by OCT and histology, including light-induced degeneration (Ruggeri et al. 2007; Fischer et al. 2009; Huber et al. 2009). In those studies, major retinal changes like strong oedema, layer degeneration or rosette formation were detected in histology and OCT. In the present study, we looked for more subtle changes and correlated the findings with patient images.

Table 1. Summarizing of key findings in OCT compared to histology.

	OCT	Histology
General issues		
Differing axial and horizontal scale	+	–
Workup artefacts/distortion	–	+
Follow up of identical lesions	+	–
Staining for function/genetics	–	+
Availability of patient images	+	–
Lesion appearance		
Dome-shaped changes above RPE	+	+
Lesion become first apparent in	ONL	PS
Last layer to show changes	INL	GL
Prominence of lesions	–	+
Lesion diameter	$1\frac{1}{2}$ times fundus	Like fundus
Sensitivity to layer alterations		
general	+	++
pigmented cell invasion	+	+
RPE irregularity during healing	+	+
ONL thinning/interruption during healing	+	+
full thickness damage of fresh lesions	+	+
full thickness damage of healing lesions	–	+
inner layer healing	+	–

Study design

As histological specimens from humans are scarce, rabbits are commonly used for histological investigation of photocoagulation lesions (Birngruber et al. 1983; Roider et al. 1993; Jain et al. 2008; Paulus et al. 2008). Differences of rabbit and human retina include the absence of a macula ('visual streak' in rabbits), a horizontal line of myelinated nerve fibres ('medullary ray' in rabbits), reduced retinal vasculature and others (Prince 1964). These will influence the biological response to an insult, such as photocoagulation. We compared species-dependent biological responses by OCT from rabbits and patients, and differences of OCT and histological imaging from rabbits. This design is comprehensive but allows limited conclusions about patient histology as well. We compared rabbit OCT images to histological slides from different animals, which did not allow us to image identical lesions in both OCT and histology, and which is a limitation of our study design.

Global similarities of imaging methods

Optical coherence tomography and histology both detected dome-shaped layer changes above the irradiated RPE, as expected by the heat diffusion theory (Birngruber et al. 1985). In healing lesions, thickening and irregularity of the RPE/BM complex and thinning of the ONL are common to all images. Big round pigmented cells infiltrate the lesions in histology, possibly melanophages or RPE cells. Round, dark structures are also present in OCT images, so-called small dense particles (Framme et al. 2010). These occur in different retinal pathologies and have been discussed to represent migrating RPE cells or leucocytes.

Global differences of imaging methods

Retinal lesions appear prominent only in histology. This should not be mistaken for photoreceptor outer segment elongation due to decreased RPE phagocytotic activity, because it is obviously an artefact and does not occur in OCT. In histology, the first laser-induced changes appear in the outermost PS. As expected, this is just

above the RPE, which is the heat source in photocoagulation. In OCT, the first alterations are located in the ELM and IS/OS-junction (rabbit) or the ONL (patient), respectively. This must be related to an affection of entire photoreceptor cells, possibly an organelle shift, after injury to PS. Spaide & Curcio (2011) have previously shown that OCT reflectivity may be changed by organelles other than melanosomes, such as mitochondria.

Our finding that OCT GLD's are almost 1½ times larger than histological GLD's, supports the idea that OCT imaging detects different tissue conditions than histological imaging.

Qualitative analysis of axial lesion extension

Axial damage extensions vary according to species and imaging.

Affection of the GL after 1 hr is first visible in:

- (1) rabbit histology of medium intensity lesions
- (2) rabbit OCT of strong lesions
- (3) patient OCT of medium intensity lesions.

Affection of the GL during the healing stage becomes apparent in all rabbit images of medium intensity lesions, but not in OCT images of patient medium intensity lesions. Possibly, the greater retinal thickness provides some protection to the GL in patients, or OCT fails to detect GL damage.

During healing, thinning of the ONL is found in:

- (1) rabbit histology of threshold/weak lesions
- (2) rabbit OCTs of RPE bleb/medium intensity lesions
- (3) patient OCT of threshold lesions

Complete interruption of the ONL is visible in:

- (1) rabbit histology of RPE bleb lesions
- (2) never in rabbit OCTs
- (3) patient OCT of medium intensity lesions after 1 month.

Obviously, rabbit OCT shows less layer damage than histology in comparable lesion intensities. On the other hand, OCT in patients shows the same changes than rabbit histology at a

comparable intensity level, leading to the assumption that human retina is more susceptible to photocoagulation damage than rabbit retina.

Comparison of full thickness lesions

In early histology of the strongest lesions, the retina seems to be structurally well preserved due to immediate fixation by heat (Lorenz 1988). The intense, full thickness nature of the retinal damage becomes more obvious during wound healing (Fig. 3G). In OCT, retinal layer darkening does not proceed continuously from the outer to the inner retina, but the last layer to darken is the INL (strongest lesions), after the IPL and GL (strong lesions).

A third nuclear layer is a striking artefact of strong and strongest lesions in histology. It results from a lateral retinal shift of healthy over heat fixated tissue, as has been beautifully worked out by Lorenz (1988). It is also implicated by Sramek's analysis of theoretically expected versus histologically detected damage diameters in the RPE and ONL (Sramek et al. 2009). A third nuclear layer may be suspected behind a third bright band outside the ONL in the rabbit OCT of the strongest lesion, but does not occur in patient OCTs.

Conclusion from qualitative analysis

In summary, lesion intensity is underestimated in rabbit OCT as compared to rabbit histology. Equal layer damage appears in OCT images of more intense lesions than in histology, and it disappears sooner. The damage during the healing period of equal primary intensities appears more pronounced in patient OCTs than in rabbit OCTs. Consequently, histology of patient lesions may reveal more extensive damage than rabbit histology of a given lesion intensity. Histologically, the axial damage becomes more obvious as the lesions heal, while it declines implausibly in OCT images of comparable lesions. It is therefore questionable if intact inner layers in OCT are a clue to structural or functional retinal recovery, as has been postulated (Muqit et al. 2011).

Our results pinpoint the necessity to look at the inner retinal changes very

carefully on OCT images, possibly in highly upsampled '1:1 μm '-mode, in order not to miss histologically relevant changes.

Outlook, modern OCT systems

Because significantly improved OCT systems have continuously been developed (Baumann et al. 2012; Jonnal et al. 2012; Müller et al. 2012), more detailed *in vivo* retinal imaging will be at hand. The improvements will still be subject to the principal differences between optical and chemical 'staining'. Because histology has been the gold standard to observe and explain pathophysiology in decades, its correlation will remain the benchmark for the interpretation of high tech images. We present such a correlation at the example of histology and up-to-date OCT images obtained from rabbit eyes.

Conclusions

Optical coherence tomography images indicate different tissue changes than histologic images. After photocoagulation, they show wider horizontal damage diameters, but underestimate axial damage particularly during healing. Conclusions on retinal restoration should not be drawn from OCT findings alone. Retinal recovery after comparable initial lesions appears to be more complete in rabbit than in patient OCTs.

Acknowledgements

The presented data were obtained in a collaborative project which is supported by the German Ministry of Education and Research (BMBF) grant #01EZ0734 (Department of Ophthalmology, University hospital of Schleswig-Holstein, Campus Kiel), #01EZ0732 (Medical Laser Center Lübeck), #01EZ0733 (Institute of Biomedical Optics Lübeck) and #01EZ0735 (Carl Zeiss Meditec AG).

Monika Marquardt, Serap Luick and Barbara Fluke provided histological workup assistance.

References

Baumann B, Choi W, Potsaid B, Huang D, Duker JS & Fujimoto J (2012): Swept source/Fourier domain polarization sensi-

tive optical coherence tomography with a passive polarization delay unit. *Opt Express* **20**: 10218–10230.

Bhatnagar A, Gibson JM & Elsherbiny S (2010): Spectral domain optical coherence tomography can detect visible and sub-threshold laser burns using 532-nm laser. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* **41**: Online, e1–e3.

Birngruber R, Gabel VP & Hillenkamp F (1983): Experimental studies of laser thermal retinal injury. *Health Phys* **44**: 519–531.

Birngruber R, Hillenkamp F & Gabel VP (1985): Theoretical investigations of laser thermal retinal injury. *Health Phys* **48**: 781–796.

Dorin G (2004): Evolution of retinal laser therapy: minimum intensity photocoagulation (MIP). Can the laser heal the retina without harming it? *Semin Ophthalmol* **19**: 62–68.

Fischer MD, Huber G, Beck SC et al. (2009): Noninvasive, *in vivo* assessment of mouse retinal structure using optical coherence tomography. *PLoS ONE* **4**: e7507.

Framme C, Wolf S & Wolf-Schnurrbusch U (2010): Small dense particles in the retina observable by spectral-domain optical coherence tomography in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 5965–5969.

Hoerauf H, Feltgen N, Bartz-Schmidt KU et al. (2010): Stellungnahme der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, der Retinologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands zur Therapie des Makulaödems beim retinalen Venenverschluss. *Klin Monbl Augenheilkd* **227**: 542–556.

Hoerster R, Muether PS, Vierkotten S, Schröder S, Kirchhoff B & Fauser S (2012): In-vivo and ex-vivo characterization of laser-induced choroidal neovascularization variability in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **250**: 1579–1586.

Huang D, Swanson E, Lin C et al. (1991): Optical coherence tomography. *Science* **254**: 1178–1181.

Huber G, Beck SC, Grimm C et al. (2009): Spectral domain optical coherence tomography in mouse models of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**: 5888–5895.

Jain A, Blumenkranz MS, Paulus Y, Wiltberger MW, Andersen DE, Huie P & Palanker D (2008): Effect of pulse duration on size and character of the lesion in retinal photocoagulation. *Arch Ophthalmol* **126**: 78–85.

Jonnal RS, Kocaoglu OP, Wang Q, Lee S & Miller DT (2012): Phase-sensitive imaging of the outer retina using optical coherence tomography and adaptive optics. *Biomed Opt Express* **3**: 104–124.

Kang H, Su L, Zhang H, Li X, Zhang L & Tian F (2010): Early histological alteration of the retina following photocoagulation treatment in diabetic retinopathy as measured by spectral domain optical coherence

tomography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **248**: 1705–1711.

Kiernan DF, Mieler WF & Hariprasad SM (2010): Spectral-domain optical coherence tomography: a comparison of modern high-resolution retinal imaging systems. *Am J Ophthalmol* **149**: 18–31.

Kim SY, Muftuoglu O, Nick Hogan R, Dwight Cavanagh H, McCulley JP & Vinod Mootha V (2012): Histopathology and Spectral Domain OCT Findings of Pneumatic-Assisted Dissection in DALK. *Cornea* **31**: 1288–1293.

Koinzer S, Schlott K, Portz L et al. (2012a): Correlation of temperature rise and optical coherence tomography characteristics in patient retinal photocoagulation. *J Biophotonics* **5**: 889–902.

Koinzer S, Schlott K, Ptaszynski L et al. (2012b): Temperature controlled retinal photocoagulation - a step toward automated laser treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**: 3605–3614.

Lorenz B (1988): Morphological changes of chorioretinal argon laser burns during the first hour post exposure. *Lasers Life Sci* **3**: 207–226.

Müller HH, Ptaszynski L, Schlott K et al. (2012): Imaging thermal expansion and retinal tissue changes during photocoagulation by high speed OCT. *Biomed Opt Express* **3**: 1025–1046.

Muqit MMK, Denniss J, Nourrit V, Marcelino GR, Henson DR, Schiessl I & Stanga PE (2011): Spatial and spectral imaging of retinal laser photocoagulation burns. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**: 994–1002.

Paulus YM, Jain A, Gariano RF, Stanzel B, Marmor M, Blumenkranz MS & Palanker D (2008): Healing of retinal photocoagulation lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**: 5540–5545.

Prince JH (1964): The rabbit in eye research. Springfield, IL: Charles Thomas Publisher.

Roider J, Michaud N, Flotte T & Birngruber R (1993): Histologie von Netzhautläsionen nach selektiver Mikrokoagulation des retinalen Pigmentepithels. *Ophthalmologie* **90**: 274–278.

Ruggeri M, Wehbe H, Gregori G, Jockovich ME, Hackam A, Duan Y & Puliafito CA (2007): *In vivo* three-dimensional high-resolution imaging of rodent retina with spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**: 1808–1814.

Schlott K, Koinzer S, Ptaszynski L, Bever M, Baade A, Roider J, Birngruber R & Brinkmann R (2012): Automatic temperature controlled retinal photocoagulation. *J Biomed Opt* **17**: 061223.

Spaide RF & Curcio CA (2011): Anatomical correlates to the bands seen in the outer retina by optical coherence tomography: literature review and model. *Retina* **31**: 1609–1619.

Sramek C, Paulus Y, Nomoto H, Huie P, Brown J & Palanker D (2009): Dynamics of retinal photocoagulation and rupture. *J Biomed Opt* **14**: 34007.

Srinivasan VJ, Monson BK, Wojtkowski M et al. (2008): Characterization of outer retinal morphology with high-speed, ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**: 1571–1579.

Tinley CG & Gray RH (2009): Routine, single session, indirect laser for proliferative diabetic retinopathy. *Eye* **23**: 1819–1823.

Toth C, Birngruber R, Fujimoto J, Boppart S, Hee M, Dicarolo CD, Cain CP & Roach WP (1995): Correlation between optical coherence tomography, clinical examination and histopathology of macular laser lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**: 207.

Ziemssen F, Hillenkamp J, Bertram B et al. (2010): Stellungnahme der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, der Retinologischen Gesellschaft und des Berufsverbands der Augenärzte Deutschlands zur Therapie der diabetischen Makulopathie. *Klin Monbl Augenheilkd* **228**: 446–459.

Correspondence:

Stefan Koinzer, MD
 Department of Ophthalmology
 University of Kiel
 House 25
 Arnold-Heller-Str. 3
 24105 Kiel
 Germany
 Tel: + 49 (4 31) 5 97 46 97
 Fax: + 49 (4 31) 5 97 24 28
 Email: koinzer@auge.uni-kiel.de

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Displays linear regression analyses of rabbit OCT GLD's (black) and histological diameters (grey) at timepoints 1 hr, (solid lines), 1 week (dotted lines) and 4 weeks after treatment (interrupted lines) over ophthal-

moscopical diameter after 1 hour. All linear correlations are statistically significant ($p < 0.001$) as indicated in the supplementary Table. A very light grey line indicates equal x and y values. Lesion diameters shrink over time, and histological diameters are invariably smaller than OCT GLD's.

Table S1. Table S1 lists the parameter sets of all linear regressions shown in Figure S1. The linear correlation of OCT GLD's / histological diameters to ophthalmoscopic diameters gives high R^2 values for 1 hour images, but the correlations of the initial ophthalmoscopic appearance with the later imaging GLD's become looser, which results in lower R-values. The data show a plausible trend which is consistent with our statements. Only lesions that allowed unequivocal diameter assessment were included in the analysis.

Received on August 28th, 2012.

Accepted on April 14th, 2013.

Photocoagulation in Rabbits: Optical Coherence Tomographic Lesion Classification, Wound Healing Reaction, and Retinal Temperatures

Stefan Koinzer, MD,^{1*} Carola Hesse,¹ Amke Caliebe, PhD,² Mark Saeger, MD,¹ Alexander Baade, MSc,³ Kerstin Schlott, MSc,³ Ralf Brinkmann, PhD,³ and Johann Roider, MD¹

¹Department of Ophthalmology, University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Kiel, House 25, Arnold-Heller-Str. 3, 24105 Kiel, Germany

²Institute of Medical Informatics and Statistics, University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Kiel, House 31, Arnold-Heller-Str. 3, 24105 Kiel, Germany

³Medical Laser Center Lübeck GmbH, Peter-Monnik-Weg 4, 23562 Lübeck, Germany

Background and Objective: The rabbit is the most common animal model to study retinal photocoagulation lesions. We present a classification of retinal lesions from rabbits, that is based on optical coherence tomographic (OCT) findings, temperature data, and OCT-follow-up data over 3 months.

Materials and Methods: Four hundred eighty-six photocoagulation lesions (modified Zeiss Visulas[®] 532 nm CW laser, lesion diameter 133 μ m, exposure duration 200 milliseconds or variable, power variable) were analyzed from six eyes of three chinchilla gray rabbits. During the irradiation of each lesion, we used an optoacoustics-based method to measure the retinal temperature profile. Two hours, 1 week, 1 month, and 3 months after the treatment, we obtained fundus color and OCT (Spectralis[®]) images of each lesion. We classified the lesions according to their OCT morphology and correlated the findings to ophthalmoscopic and OCT lesion diameters, and temperatures.

Results: Besides an undetectable lesion class 0, we discerned subthreshold lesions that were invisible on the fundus but detectable in OCT (classes 1 and 2), very mild lesions that were partly visible on the fundus (class 3), and 3 classes of suprathreshold lesions. OCT greatest linear diameters (GLDs) were larger than ophthalmoscopic lesion diameters, both increased for increasing classes, and GLDs decreased over 3 months within each class. Mean peak end temperatures for 200 milliseconds lesions ranged from 61°C in class 2 to 80°C in class 6.

Conclusion: The seven step rabbit lesion classifier is distinct from a previously published human lesion classifier. Threshold lesions are generated at comparable temperatures in rabbits and humans, while more intense lesions are created at lower temperatures in rabbits. The OCT lesion classifier could replace routine histology in some studies, and the presented data may be used to estimate lesion end temperatures from OCT images. *Lasers Surg. Med.* 45:427–436, 2013.

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: spectral domain; OCT; laser; laser photocoagulation; optoacoustics; real-time temperature measurement; animal model; subthreshold

INTRODUCTION

Retinal laser photocoagulation was introduced in the late 1940s [1] and has been modified over time [2], but remains the gold standard for the treatment of peripheral retinal ischemic diseases, most prominently diabetic retinopathy and ischemic retinal vein occlusion, and is an adjunctive or second line therapy for diabetic macular edema [3–5]. Much scientific effort has been undertaken in the past 10–20 years to improve the treatment, and more recent technical achievements include micropulse treatment [6], even selective retinal pigment epithelial (RPE) treatment [7], pattern application [8], fundus-image correlated automatic laser navigation [9], and temperature-feedback automatic laser irradiation time control [10,11].

Conflicts of Interest: Ralf Brinkmann holds patent rights on some of the mentioned devices.

Contract grant sponsor: German Ministry of Education and Research (BMBF) according to the Innovation Award for Advancing Medical Technology 2006; Contract grant number: #01EZ0734; Contract grant sponsor: Department of Ophthalmology, University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Kiel; Contract grant number: #01EZ0732; Contract grant sponsor: Medical Laser Center Lübeck; Contract grant number: #01EZ0733; Contract grant sponsor: Institute of Biomedical Optics Lübeck; Contract grant number: #01EZ0735; Contract grant sponsor: Carl Zeiss Meditec AG.

*Correspondence to: Stefan Koinzer, MD, Department of Ophthalmology, University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Kiel, House 25, Arnold-Heller-Str. 3, 24105 Kiel, Germany. E-mail: koinzer@auge.uni-kiel.de

Accepted 13 July 2013

Published online in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/lsm.22163

For many of these innovations, preclinical animal studies have used the rabbit model. Rabbit eyes are of comparable size as human eyes which facilitates the use of patient laser contact lenses. Thirty to 40 years ago, several experimental studies were conducted on primate eyes and histologic studies on human enucleated eyes [12–18], but more recent histologic analyses of laser photocoagulation effects have mostly been conducted on rabbit material [7,10,12,16,19–22]. Rodents, in contrast, are frequently used in the context of laser-induced choroidal neovascularization, but seldom in the context of photocoagulation treatment [23,24].

In spite of its commonness, the rabbit model has important anatomical differences to human retina which include the absence of a macula and the presence of a visual streak in rabbits, a medullary ray (MR) that extends horizontally from the optic disk, different retinal thicknesses, and reduced retinal vasculature [25]. The retinal thickness in the commonly used area below the MR is 150–180 μm (1–6 mm below the MR) (Koinzer et al., under publication). Hence, researchers need to be aware of the specific limitations of the rabbit model. In a previous publication, we have demonstrated how human and rabbit retina react differently to soft and moderate laser photocoagulation [26]. At comparable lesion intensity, we detected more pronounced retinal layer affection in patient optical coherence tomographic (OCT) images compared to rabbit OCT images in the acute phase. Moreover, we found limited restoration of the inner retinal layers in patient OCT images after 1 month, while these layers appeared to recover very well in rabbit OCT images even in stronger lesions. In the present study, we present a systematic analysis of different intensity rabbit retinal photocoagulation lesions that we observed in high-resolution OCT images over 3 months. Furthermore, we give mean peak end temperatures that occurred at the RPE level during laser irradiation, and that allow to derive specific temperature endpoints for subthreshold and suprathreshold photocoagulation on rabbit retina.

In spite of the biological limitations of the rabbit model, which we have recently investigated, there are good reasons for its use. Porcine eyes, in contrast, are easy to access for *ex vivo* investigations, but they differ from human eyes as well, as by absence of a macula. For *in vivo* experiments, rabbits are easy to handle, particularly in the setting of physics laboratories. Their use is appropriate for technical *in vivo* experiments, such as testing of device functionality or safety. For these experiments, an OCT-based photocoagulation lesion classifier would be useful. If biological questions are addressed, however, such as wound healing or cytokine expression, researchers need to be aware of the specific limitations of the rabbit model (healthy retina) compared to (diseased) human eyes.

MATERIALS AND METHODS

Animal Photocoagulation Study

We performed photocoagulation on 6 eyes of 3 chinchilla gray rabbits and applied 1,022 lesions. The breed was

chosen because of its large (eye) size and its particularly homogenous fundus pigmentation. The animals were treated under general and local anesthesia, with dilated pupils. A modified Mainster focal grid laser contact lens was fitted onto the eye with methylcellulose gel (2%) and mechanically fixed in its position. We performed photocoagulation with a modified 532 nm continuous wave (CW) laser system (VISULAS VITE, Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany). The irradiation diameter was 200 μm in air and 133 μm on the fundus. Exposure times were 200 milliseconds or variable, automatically controlled as described elsewhere [10,11]. For the automatically controlled exposures, we used noninvasive real-time temperature feedback to adjust irradiation times individually for each lesion in order to achieve homogenous lesions, independently of power, local optical transmission, and local pigmentation.

The rabbits were maintained in animal units at the University Medical Center of Schleswig-Holstein, and all animal experiments were performed according to the German law for protection of animals and approved by the Ministry of Energy Transition, Agriculture, Environment and Rural Areas of Schleswig-Holstein, Kiel, Germany (application no. V312-7234.121-11). All experiments adhered to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

Color Fundus Imaging and Retinal Lesion Diameter Assessment

We obtained fundus color photographs of the rabbit fundi 2 hours after the treatment session, using a Zeiss VISUCAM (Carl Zeiss Meditec AG). All study lesions were individualized by mapping them on fundus images, and the technical parameters power, exposure time, irradiation diameter, and retinal peak end temperature recorded. Figure 1 shows a representative panoramic fundus image taken 2 hours after the treatment. The figure has been digitally assembled from several single images using Hugin software Version 2010.2.0 (www.hugin.sourceforge.net).

We assessed the area of each photocoagulation lesion that we identified on the 2-hour color fundus images and calculated the corresponding circle diameter. Edematous halos were excluded from the area measurements, because such halos occur only in a small subset of lesions, are strongly time dependent and do not have a clear histological correlate. Ophthalmoscopic lesion diameters without the halo have been found to be equal to histological lesion diameter and are considered the most valid measure [19,26].

The area of a study lesion was assessed manually by three independent observers. They outlined every lesion, measured the pixel size of the lesion, and calculated the pixel and real diameters. The pixel-to-micrometer ratio had been determined in preliminary experiments and was $9.5 \pm 0.7 \mu\text{m}/\text{pixel}$. If only one observer recognized a particular lesion, it was evaluated as invisible (diameter 0), otherwise the mean diameter was considered to be the real spot size. Comparing the three measurements, we

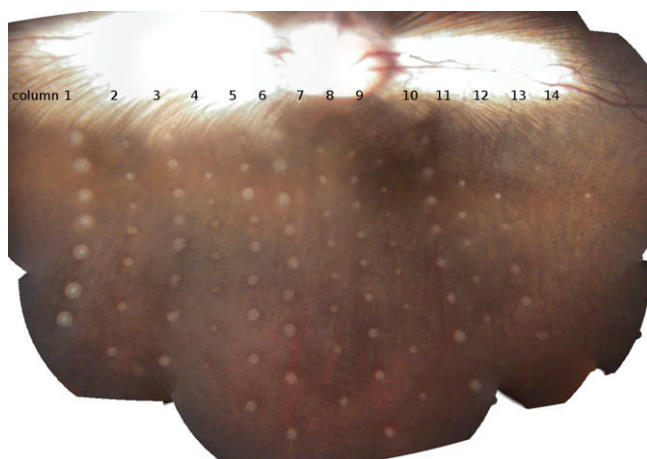


Fig. 1. One representative rabbit fundus panorama, which was digitally assembled from several photographs. Five columns on the left were applied with 55 mW, the following five columns were applied with 49 mW, and the four columns on the right were applied with 33 mW. Exposure times were 200 milliseconds in the 1st, 6th, and 11th columns and variable, automatically controlled in the rest. The 13th and 14th columns were mostly subthreshold treatments and are therefore barely visible or invisible in the fundus image.

excluded out-of-range values, if the standard deviation was $>40 \mu\text{m}$ and the median differed more than 15% from the mean. We chose that method in order to rule out any observer-dependency and bias in the assessment of faint and/or poorly outlined fundus lesions.

OCT Analysis

Horizontal OCT image series were acquired 2 hours, 1 week, 1 and 3 months after the treatment. We scanned the treated area in $30 \mu\text{m}$ steps using a spectral domain OCT (HRA + OCT Spectralis[®], Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). Every sectional image was obtained by averaging of 20 B-scans to optimize image quality. If a lesion could be identified, as exemplarily shown in Figure 2, we traced it through the consecutive series of OCT images using the AutoRescan[™] function. The time required for good quality imaging (fundus color images and OCT) depended on the clarity of the media. It could take as much as 2–3 hours in cases where cataract or methylcellulose remnants blurred the image.

The greatest linear diameter (GLD) of a lesion was measured the proprietary OCT software. Measurements were carried out in the $1:1 \mu\text{m}$ depiction and the highest magnification ($\times 8$). We measured the GLD at the photoreceptor inner segment-to-outer segment junction line (IS–OS) or, if this measurement was not unequivocal, at the retinal pigment epithelium (RPE) level. In order to

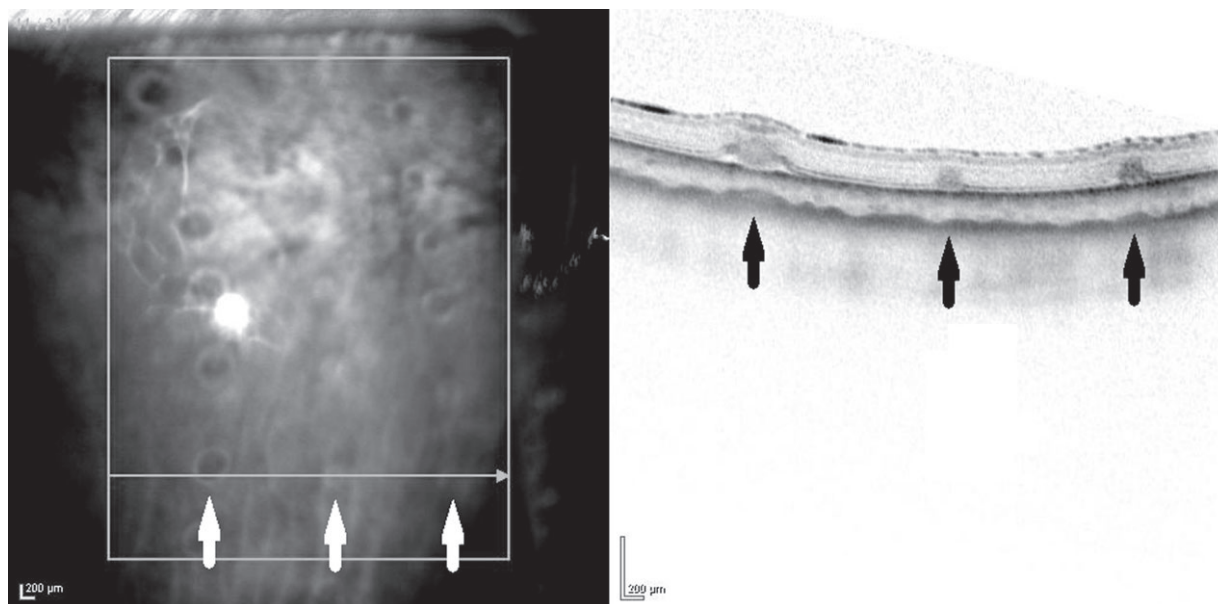


Fig. 2. An image as generated by our spectral domain OCT device. The left shows an infrared image (IR) of the fundus, with the medullary ray at the upper border. The right part of the figure shows one individual cross-sectional OCT image. Note that the scale of the cross-sectional image is four times greater in vertical than in horizontal direction due to differential resolutions of the device ("1:1 pixel" mode), giving the image a distorted appearance compared to histology slides. A light gray box in the left image shows the area which was covered by the OCT scans. It contains three columns of photocoagulation lesions. The light gray horizontal arrow demarcates the position and direction of the actual scan shown on the right, and three white arrows highlight three photocoagulation lesions which are also visible in the cross-sectional image on the right and are highlighted by black arrows.

measure the GLD of a lesion, each horizontal section of the lesion was thoroughly scanned, and the widest diameter passing through the lesion was measured as GLD.

All lesions that could be identified in OCT images were digitally cut out and assembled in composites of four consecutive images (2 hours, 1 week, 1 month, and 3 months post-treatment, see Fig. 3). If the RPE was not dissected horizontally, we cropped images to align it. In the composites, we looked for common attributes of the lesions and arranged them in subgroups with apparently increasing intensity. This led to seven consecutive classes of OCT morphologies as displayed in Figure 3. All lesion classifications were made according to their appearance in the 2-hour OCT images.

Retinal Temperature Measurement

We measured the retinal temperature profile during treatment laser irradiation in real-time and noninvasively on the basis of optoacoustics. In short, we superimposed a pulsed 523 nm laser ("probe laser," 75-nanosecond pulses, 3–8 μ J) collinearly and coaxially to the treatment irradiation (treatment laser). The pulses were emitted at a repetition rate of 1 kHz and caused short, innocuous temperature increments within the irradiated tissue that induced short, reversible thermoelastic tissue expansions. The extent of these expansions depends on the tissue temperature. Expansions cause pressure waves that propagate through the eye, and these were detected by an embedded transducer in the mainster contact lens. Its signals were digitally processed and allowed, under certain preconditions, calculation of the spatial and temporal retinal temperature profile during treatment irradiation.

Based on the heat diffusion theory, we adapted functions of the expected temperature course to the optoacoustic raw data in order to calculate temperatures. These functions compensate for noise and artifacts (such as low frequency sinusoid motion artifacts like on the green plot in Fig. 4). Furthermore, they allow prospective calculation of end temperatures, if interfering signals like microevaporation bubbles or values outside the defined temperature conversion range prevent temperature calculation during the entire irradiation (as in the blue plot from time point 101 milliseconds). All temperature values given in this study were calculated from fit functions for the end of the irradiation time (temporal peak) in the lesion center at the RPE level (spatial peak). Optoacoustic measurements start 20 milliseconds prior to the treatment irradiation in order to calibrate the signals to the actual treatment site and to body temperature. The method has been thoroughly described elsewhere [11,26,27].

Statistics

We used Fisher's exact test for the analysis of the two categorical variables OCT lesion class and visibility. We calculated corresponding *P* values on the basis of a Monte-Carlo simulation for 10,000 samples. The influence of the OCT class on lesion diameters in fundus images and OCT GLDs was tested nonparametrically for each variable separately in a Kruskal–Wallis test with a *post hoc* analysis.

For the analysis of retinal temperatures on the subset of 200 milliseconds lesions, the influence of the OCT class was tested by an ANOVA analysis with individual eye as an additional random factor followed by a Scheffé *post hoc* analysis.

All tests displayed were two sided. *P* values below 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were carried out with SPSS software, Version 20.

RESULTS

OCT Morphological Lesion Classes

Of 1,022 study lesions applied, 625 were covered by the OCT images, including 22 lesions that were invisible, class 0. Of the remaining 603 visible lesions, 464 finished the study with a complete dataset including color fundus images after 2 hours and OCT images at all four time points. Their consecutive arrangement led to the identification of six classes of detectable lesions with distinct morphological properties. Each increasing class includes the characteristics of the previous. A complete data and image set for a representative lesion of each class is shown in Figure 3a, and a layer and abbreviation legend is displayed in Figure 3b. The retina consists, from inner to outer retina, of the following layers as displayed by OCT: Ganglion cell and nerve fiber layer (GL), inner plexiform layer (IPL), inner nuclear layer (INL), outer plexiform layer (OPL), outer nuclear layer (ONL), then photoreceptor segments, and finally as one line the outermost photoreceptor outer segment tips, RPE and Bruch's membrane (BM). Beyond this line follows the choroid. Photoreceptor segments are delineated from the ONL by the external limiting membrane (ELM) and divided by the photoreceptor IS–OS junction line into photoreceptor inner segments (IS) and photoreceptor outer segments (OS).

The OCT-based morphological lesion classes showed the following characteristics:

- Class 0: Lesion never became detectable in OCT images (not shown).
- Class 1: Thickening of the IS–OS junction line, and slight darkening of the ONL. These lesions may be easily missed in OCT images.
- Class 2: Dark column throughout the OS, IS, and ONL layers, wider than in a class 1 lesion. The ELM remains flat.
- Class 3: Thinning of the RPE. Upward protrusion of IS–OS junction line and ELM, but preserved layer continuity. Darkening includes partial thickness of the IPL but is discontinuous and spares the OPL and the INL.
- Class 4: RPE is detached from BM and protrudes upward, while the space in between remains dark. Dark PS–OS tips, IS–OS junction line and ELM are interrupted and bent upward at the lesion border. PS–OS tips and IS–OS junction lines merge at the lesion border. IPL darkening increases compared to class 3.

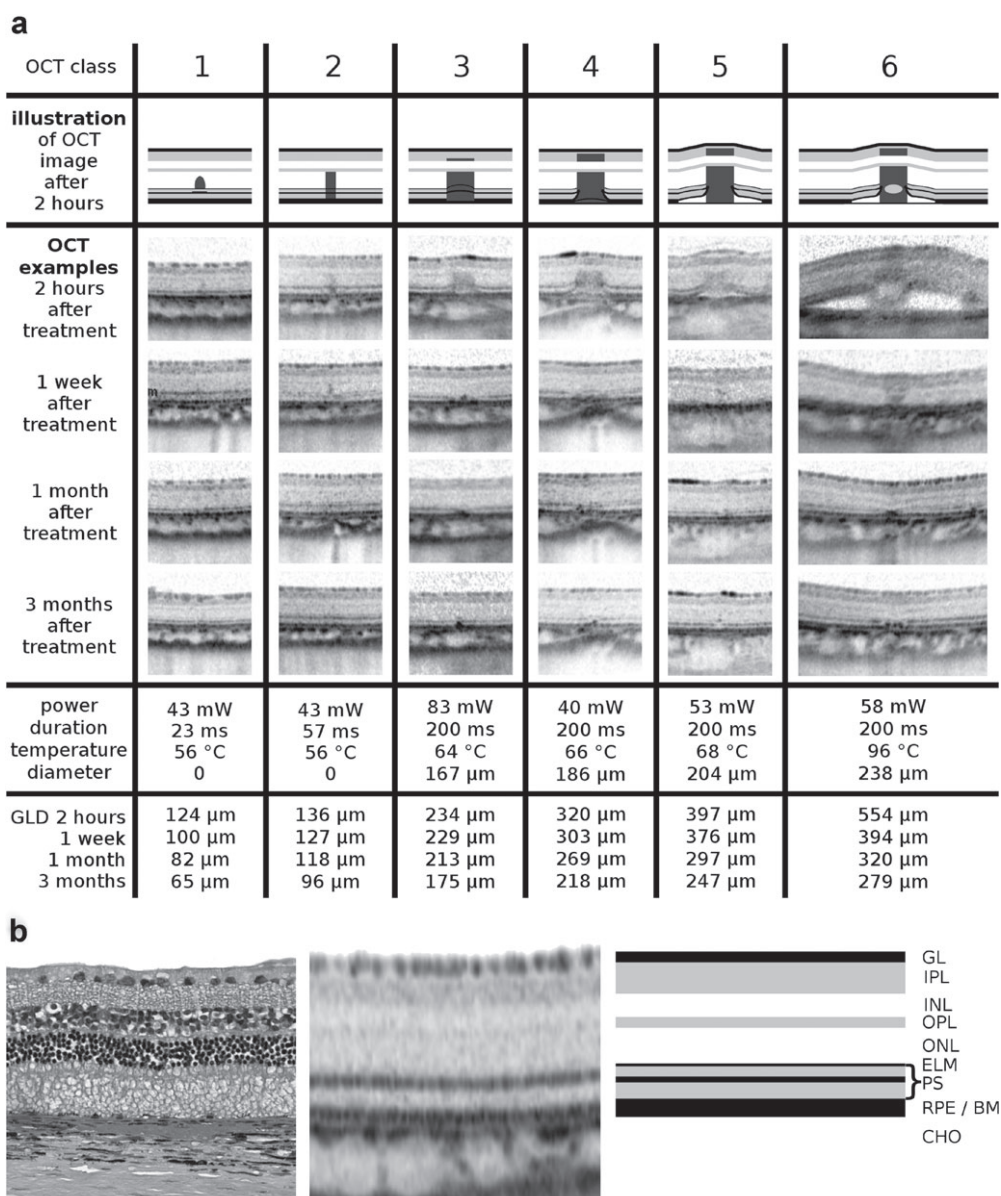


Fig. 3. **a:** Characteristic lesion appearance of each lesion class as determined in this study for rabbits. All lesions were irradiated with a diameter of 133 μm on the fundus. Lesions displayed for classes 3–6 were irradiated for 200 milliseconds. As lesion classes 1 and 2 were not reliably achieved at 200 milliseconds, lesions with shorter irradiation times are shown instead. Illustrations of the typical appearance of each class in the 2-hour OCT images are shown on top of the columns, and below representative OCT images taken 2 hours, 1 week, 1 month, and 3 months after the treatment. All images in a column show the same fundus lesion during follow-up. Below the OCT images, the parameters power, exposure time, peak temperature, and the diameter as measured on the 2-hour fundus color image are given (0 value indicates that the lesion was invisible in the fundus image). In the very bottom line, the GLDs that were measured in the above OCT images at all four timepoints are given. The retinal layer legend and layer abbreviations are explained in (b) below. **b:** Retinal layer legend, showing aligned retinal images from rabbits in histology (left), spectral domain OCT (middle), and a schematic drawing as used in (a) (right). GL, ganglion cell and nerve fiber layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer (photoreceptor nuclei); ELM, external limiting membrane; PS, photoreceptor segments; RPE/BM, retinal pigment epithelium and Bruch's membrane; CHO, choroid. The PS form a wide gray band in between the ELM and the RPE in OCT images that is divided by a dark line, the inner segment–outer segment junction line (IS–OS). Histologically, the IS are denser than the OS and are rich in mitochondria, while the OS contain the membrane disks. The IS–OS junction line is a specific phenomenon in OCT without a clear histological correlate. The outermost OS, RPE, and BM form one dark band in OCT and may not be distinguished unless they are detached.

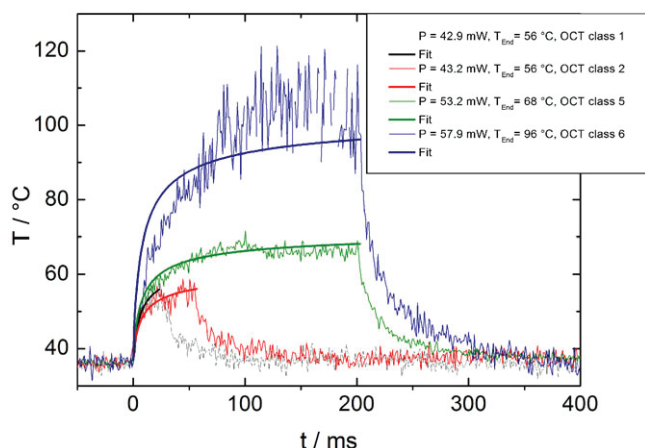


Fig. 4. Optoacoustic temperature data of lesions that are displayed in Figure 3a. Thin lines represent optoacoustic raw data and thick lines best-adapted functions of the expected temperature rise according to the heat diffusion theory. Temperatures are calculated from these functions for the spatial peak, that is, the lesion center at the RPE level, and for the temporal peak, that is, at the end of the irradiation (T_{End}). P , treatment laser power. The raw data in the blue plot reach optoacoustic values that are outside the defined range of the temperature conversion function after 101 milliseconds. Therefore, the fit function is based on the measurements over 100 milliseconds.

Class 5: Perilesional neurosensory detachment which protrudes the entire retina upward. Facultative discoloration of the GL.

Class 6: Additional bright spot in the dark central column at the level of the PS. Facultative full thickness darkening including OPL and INL.

Notably, the class 1 and 2 lesion examples were achieved at similar end temperatures, but were irradiated for different durations, which accounts for different intensities. These lesions were ophthalmoscopically invisible (subthreshold), but yet effective as proven by the OCT images. Increasing lesion classes have increasing fundus diameters and are produced by increasing peak retinal temperatures but not by increasing powers (due to transmission and pigmentation variation). GLDs are greater than ophthalmoscopic diameters. GLDs decrease over time, but GLDs at any particular timepoint are greater for greater lesion classes. These findings will be statistically substantiated below.

Evaluation of Morphological Lesion Properties

Figure 5 displays the percentage of lesions in each class that were visible on the color fundus images. Visibility rates were 17% in class 1, 56% in class 2, 89% in class 3, and from class 4 and higher, virtually all lesions (95–98%) were visible. The differences were statistically significant ($P < 0.001$). Visibility rates confirm the consecutive order of the lower morphological classes. As visibility increases over the first hours after the treatment, immediate visibility must be expected to have been lower than the percentages depicted. Consequently, lesion classes 1 and 2

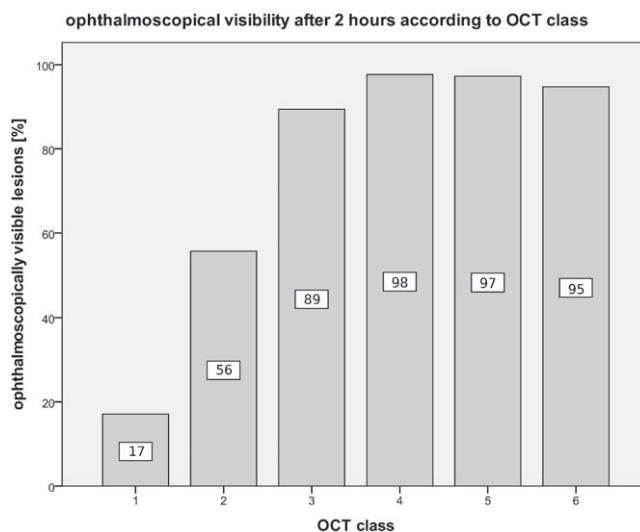


Fig. 5. Proportion of lesions in each OCT class that were visible in the fundus image taken 2 hours after the treatment.

are probably ophthalmoscopically invisible during the treatment (subthreshold), class 3 is uncertain and classes 4–6 are most likely visible. By definition, all lesions classified class 1 or higher were visible in OCT images.

The ophthalmoscopic lesion diameters and the OCT GLDs for all lesion classes are displayed in Figure 6, and the corresponding numerical data set (median and interquartile ranges [IQR]) is given in Table 1. Median

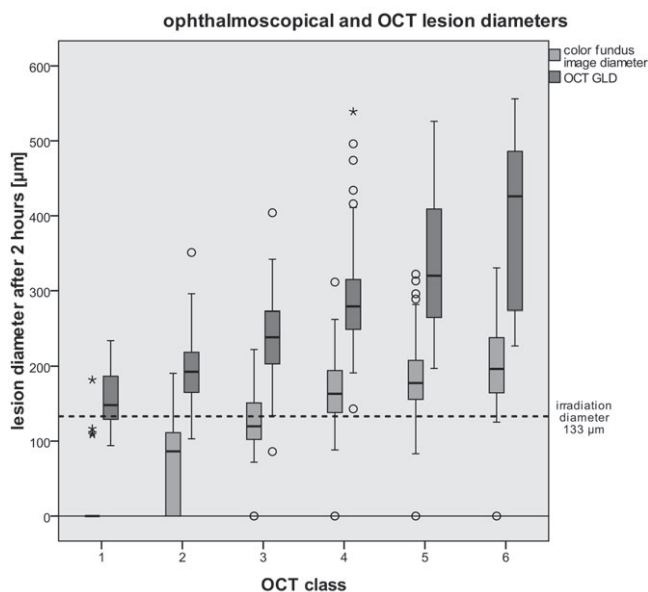


Fig. 6. Box-whisker plots of ophthalmoscopic lesion diameters (light gray) and OCT GLDs (dark gray) 2 hours after the treatment. A horizontal line depicts the irradiated fundus diameter of 133 μm . Only lesions with a complete data set (2-hour color fundus images and all four consecutive OCT images) were included in the evaluations of Figures 6 and 7. The corresponding numerical data are displayed in Table 1.

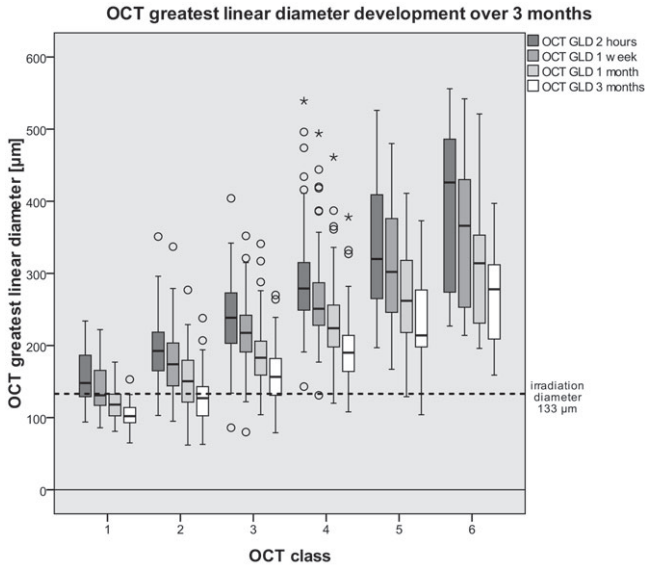


Fig. 7. Box-whisker plots of OCT GLDs over 3 months according to morphological classes. A horizontal line depicts the irradiated fundus diameter of 133 μm . The corresponding numerical data are displayed in Table 1.

ophthalmoscopic diameters were 0 μm in classes 0 and 1, and increased for every lesion class from 86 μm in class 2 to 196 μm in class 6. Median OCT GLDs were larger than median funduscopy diameters, beginning from 0 by definition in class 0, and increasing from 148 μm in class 1 up to 426 μm in class 6. The increasing diameter values confirm the order of the OCT classes. The influence of the OCT class on both the ophthalmoscopic diameter and the OCT GLD was significant ($P < 0.001$). The *post hoc* analysis for both showed no significant difference between subgroups 0 versus 1, 0 versus 2, 1 versus 2, 4 versus 5, and 5 versus 6, while all other subgroup pairs differed significantly.

The median ophthalmoscopic diameter of class 1 lesions was 0 μm , which indicates ophthalmoscopic

invisibility, while the median OCT GLD was 148 μm and nearly equals the irradiated diameter, which proves that these lesions have a reliable biological effect (truly “subthreshold” lesions). An ophthalmoscopic lesion diameter in the order of the irradiated diameter, as measured for class 3 lesions, corresponds to lesions slightly above the ophthalmoscopic visibility threshold [10,28].

The development of OCT GLDs over 3 months is given numerically in Table 1 and shown graphically in Figure 7 for each lesion class. At every time point, OCT GLDs increase with the class. Within every class, OCT GLDs shrink over time.

Temperature Evaluation

The biological effect of a laser lesion depends on the extent of a temperature increase and on the duration of tissue exposure to this temperature increase. This correlation is described by the Arrhenius theory [29]. Consequently, direct temperature comparison is only feasible for lesions that have been equally long exposed. We performed a temperature analysis on the subset of 200 milliseconds lesions ($n = 150$), where class 1 was not achieved and class 2 only in two cases. As displayed in Figure 8, mean peak end temperatures were 61°C in class 2, 62°C in class 3, 65°C in class 4, 71°C in class 5, and 80°C in class 6 lesions. An ANOVA analysis with temperature as dependent variable and OCT class and individual rabbit eye as factors showed that both, eye and OCT class, have a significant impact on the temperature value (both $P < 0.001$), and that there is no significant interaction between eye and OCT class ($P = 0.49$).

DISCUSSION

This study suggests a sevenfold morphological classifier for photocoagulation lesions in rabbit eyes. The classifier is based on OCT findings from 6 eyes of 3 rabbits that were treated with 1,022 photocoagulation lesions of 133 μm irradiation diameter and variable power and exposure time. For 464 visible and 22 invisible lesions (486 total), we obtained a complete dataset including 2-hour fundus color

TABLE 1. Wound Healing of Different Intensity Photocoagulation Lesion in OCT

OCT class	n	Ophthal diam 2 hours (μm)	GLD			
			2 hours (μm)	1 week (μm)	1 month (μm)	3 months (μm)
1	27	0 (0)	148 (129–189)	131 (116–168)	118 (101–134)	102 (90–116)
2	64	86 (0–112)	193 (164–219)	174 (144–204)	151 (121–180)	127 (102–143)
3	110	120 (102–151)	239 (203–273)	218 (191–243)	183 (159–207)	157 (131–182)
4	145	163 (138–194)	279 (249–316)	251 (228–289)	224 (198–256)	190 (164–214)
5	77	178 (155–210)	320 (264–413)	302 (244–376)	262 (218–322)	214 (197–278)
6	41	196 (163–241)	426 (273–486)	366 (252–431)	314 (227–359)	278 (209–314)

Ophthalmoscopic diameters after 2 hours and OCT GLDs at all four timepoints for all OCT classes. The same data are displayed graphically in Figures 6 and 7. The table shows median and interquartile range (IQR) values. Only lesions with a complete data set (2-hour color fundus images and all four consecutive OCT images) were included in the evaluation. Consequently, class 0 lesions were excluded from this evaluation (median fundus image diameter = 0, median GLD = 0 at all examinations). GLDs remain larger than the initial ophthalmoscopic defect throughout the observed period.

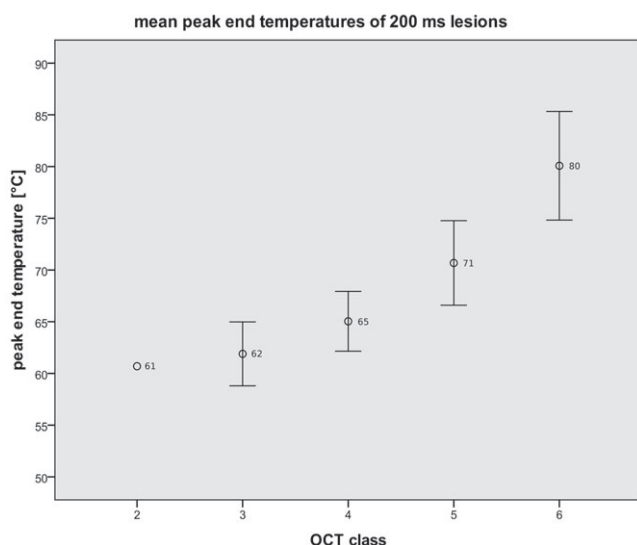


Fig. 8. Mean temperatures for each lesion class, only 200-millisecond lesion-subgroup ($n = 150$). Class 1 was not achieved with 200-millisecond exposures, and class 2 only in two cases. For the other classes, mean peak end temperatures and 95% confidence intervals for the mean are shown graphically and mean temperatures also numerically ($^{\circ}\text{C}$).

images and 4 OCT images after 2 hours, 1 week, 1 month, and 3 months. Quantitative analyses of ophthalmoscopic lesion diameters and OCT GLDs confirmed the order and validity of the morphological lesion classes. For the subgroup of 200-millisecond exposures that were visible in OCT images ($n = 150$), we present mean peak end temperatures, that occurred at the end of the irradiation at the RPE level and ranged from 61°C for class 2 to 80°C for class 6.

Retinal laser photocoagulation has recently aimed at decreasing lesion intensities [2], which may be ophthalmoscopically invisible [30,31] and where the physician lacks an adequate feedback to properly adjust laser power. For this reason, an objective OCT-based classification particularly of soft photocoagulation lesions would be helpful, since it allows an objective description of such lesions [32,33]. It is, however, limited to a lesion judgment after treatment and would require a slit-lamp adapted OCT for laser power control during treatment. The presented OCT lesion classifier is very sensitive and can detect lesions that do not even become visible on the fundus after 2 hours (class 1), but also differentiates very fine grades beyond these completely subthreshold lesions (classes 2 and 3). Classes 4–6 are more intense lesions like they might be used in routine photocoagulation. The OCT classifier allows to identify subgroups among these suprathreshold lesions that are not distinguishable from ophthalmoscopy alone.

We have previously developed a human OCT lesion classifier, which also discerns seven classes [33]. It shares a few characteristics with the rabbit classifier we present here, such as a bright spot in the lesion center in class 6 or initial signs of damage in the ONL in rabbit class 1 or

human class 2, respectively. The latter finding differs from histological findings, where the first layer to be coagulated is the PS layer, as has been analyzed in detail elsewhere [26]. Exsudative neurosensory detachment, which occurs frequently around intense retinal lesions in rabbits (classes 5 and 6), is not or very rarely observed in patient OCT images. In contrast, patients, but not rabbits, showed narrow annular RPE detachments at the lesion border. Lesions that were only visible in OCT images after 1 week, but not shortly after the treatment, occurred exclusively in patients. Hence, rabbit lesion classes 0–6 may be related to patient classes 0–6, but do have different OCT appearances. It is uncertain, if the classes correspond biologically.

The mean peak temperature of OCT class 2 rabbit lesions ($d = 133\text{ }\mu\text{m}$, irradiated for $t = 200$ milliseconds at $\lambda = 532\text{ nm}$) was 61°C in this study, which agrees to a previously published value of 61°C for human class 2 lesions ($d = 100\text{ }\mu\text{m}$, irradiated for $t = 100$ milliseconds at $\lambda = 532\text{ nm}$) [28]. As expected, these values are slightly higher than RPE viability thresholds that have been determined by others, such as 53°C in cell cultures (irradiated for $t = 100$ – $1,000$ milliseconds at $\lambda = 514\text{ nm}$) [33], and 53°C for rabbit lesions ($d = 50\text{ }\mu\text{m}$, irradiated for $t = 200$ milliseconds at $\lambda = 532\text{ nm}$) [34]. Sramek et al. [34] have also determined the retinal rupture threshold temperature to be 180°C . It is specific to our study that we measured temperature values for retinal lesion gradations in between the extreme values of RPE viability and retinal rupture thresholds. Obviously, the most relevant temperature window where photocoagulation lesions are generated is between 53°C and 90 – 100°C . In our previous patient study, temperatures of intense lesion classes 5 and 6 were beyond 95°C [28]. The mean peak temperature measured for rabbit class 6 lesions was 81°C , which is decidedly lower than the human value. This is plausible, as rabbit retina, which is 150 – $180\text{ }\mu\text{m}$ thick in the treated area, is thinner than patient retina, which measures 250 – $300\text{ }\mu\text{m}$ in the macula. Thinner rabbit retina should be fully coagulated at lower RPE temperatures, which is confirmed by our measurements and agrees with the clinical experience, that rabbit retina is coagulated at lower laser power settings than human retina.

In the past, histology has been the benchmark to evaluate tissue effects, such as photocoagulative damage. When comparing OCT images to histology, specific artifacts of both must be considered. Histological processing induces considerable tissue distortion of 17% lateral elongation (and/or stretching) and 33% axial shrinkage (and/or compression) according to our workup protocol (Koinzer et al., under publication). OCT displays lesion diameters almost 50% wider than calibrated histological measurements [26]. Consequently, the pathological condition of interest requires characterization for each analysis method separately, as we present here for rabbit photocoagulation lesions in OCT. OCT is in many ways advantageous, as it allows longitudinal studies of the same lesion, is nondestructive and easily available in great numbers. It

may help to spare animal lives. OCT images are available from patients as well, but animal experiments remain a precondition for patient use of novel photocoagulators, and an OCT-based lesion classifier may be useful in such studies.

The fluorescein angiography (FLA) threshold has been considered the most sensitive clinical measure for photocoagulative RPE damage. In the present study, we did not perform FLA. After the extended OCT sessions following photocoagulation treatment (~4 hours total), the media were too opaque to record useful FLA images. We assume that the FLA threshold might be close to the threshold of our class 1 lesions.

In summary, we present a simple classifier of mild and moderate photocoagulation lesions in rabbit retina, that is based on readily available OCT images acquired shortly after the treatment, and that has been validated by increasing ophthalmoscopic diameters, increasing OCT GLDs and consistent OCT-development during wound healing. Moreover, we provide temperature values according to the OCT classes of 200 milliseconds lesions, which would allow other scientists to estimate temperatures based on their own OCT images. Hence, the presented OCT lesion classifier may be useful to evaluate subthreshold rabbit photocoagulation lesions, to calibrate temperature-based laser dose control and to spare animal lives.

REFERENCES

- Meyer-Schwickerath G. Light coagulation; a method for treatment and prevention of the retinal detachment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1954;156:2–34.
- Mainster MA. Decreasing retinal photocoagulation damage: Principles and techniques. *Semin Ophthalmol* 1999;14:200–209.
- Shah AM, Bressler NM, Jampol LM. Does laser still have a role in the management of retinal vascular and neovascular diseases? *Am J Ophthalmol* 2011;152:332–339.e1.
- Statement of the German Ophthalmological Society, the Retinological Society, and the Professional Association of German Ophthalmologists on Therapy for Macular Oedema in Cases of Retinal Vein Occlusion. *Klin Monbl Augenheilkd* 2010;227:542–556.
- Recommendation of the Retinological Society, the German Ophthalmological Society, and the Professional Association of Ophthalmologists in Germany: Treatment of diabetic maculopathy. *Klin Monbl Augenheilkd* 2011;228:446–459.
- Sivaprasad S, Elagouz M, McHugh D, Shona O, Dorin G. Micropulsed diode laser therapy: Evolution and clinical applications. *Surv Ophthalmol* 2010;55:516–530.
- Roider J, Hillenkamp F, Flotte T, Birngruber R. Microphotocoagulation: Selective effects of repetitive short laser pulses. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:8643–8647.
- Velez-Montoya R, Guerrero-Naranjo JL, Gonzalez-Mijares CC, Fromow-Guerra J, Marcellino GR, Quiroz-Mercado H, Morales-Cantón V. Pattern scan laser photocoagulation: Safety and complications, experience after 1301 consecutive cases. *Br J Ophthalmol* 2010;94:720–724.
- Kozak I, Oster SF, Cortes MA, Dowell D, Hartmann K, Kim JS, Freeman WR. Clinical evaluation and treatment accuracy in diabetic macular edema using navigated laser photocoagulator NAVILAS. *Ophthalmology* 2011;118:1119–1124.
- Koinzer S, Schlott K, Ptaszynski L, Bever M, Kleemann S, Saeger M, Baade A, Caliebe A, Miura Y, Birngruber R, Brinkmann R, Roider J. Temperature controlled retinal photocoagulation—A step toward automated laser treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:3605–3614.
- Schlott K, Koinzer S, Ptaszynski L, Bever M, Baade A, Roider J, Birngruber R, Brinkmann R. Automatic temperature controlled retinal photocoagulation. *J Biomed Opt* 2012;17:061223.
- Birngruber R, Gabel VP, Hillenkamp F. Experimental studies of laser thermal retinal injury. *Health Phys* 1983;44:519–531.
- Borges JM, Charles HC, Lee CM, Smith RT, Cunha-Vaz JG, Goldberg MF, Tso MO. A clinicopathologic study of dye laser photocoagulation on primate retina. *Retina* 1987;7:46–57.
- Wallow IH. Long-term changes in photocoagulation burns. *Dev Ophthalmol* 1981;2:318–327.
- Wallow IH, Tso MO. Healing of retina following light coagulation. Clinical and morphologic studies on rhesus monkeys. *Ber Dtsch Ophthalmol Ges* 1974;72:191–199.
- Wallow IH, Birngruber R, Gabel VP, Hillenkamp F, Lund OI. Retinal reactions to intense light. I. Threshold lesions. Experimental, morphological and clinical studies of pathological and therapeutic effects of laser and white light. *Adv Ophthalmol* 1975;31:159–232.
- Townes DE, Watzke RC. Xenon photocoagulation of the papillomacular bundle. An experimental study. *Arch Ophthalmol* 1972;87:679–683.
- Blair CJ, Gass JD. Photocoagulation of the macula and papillomacular bundle in the human. *Arch Ophthalmol* 1972;88:167–171.
- Weinberg W, Gabel V-P, Birngruber R, Lorenz B, Müller W. Time sequence of the white hue correlated with the extent of damage in photocoagulation of the retina. *Ber Dtsch Ophthalmol Ges* 1981;78:603–606.
- Paulus YM, Jain A, Gariano RF, Stanzel BV, Marmor M, Blumenkranz MS, Palanker D. Healing of retinal photocoagulation lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:5540–5545.
- Paulus YM, Jain A, Nomoto H, Sramek C, Gariano RF, Andersen D, Schuele G, Leung LS, Leng T, Palanker D. Selective retinal therapy with microsecond exposures using a continuous line scanning laser. *Retina* 2011;31:380–388.
- Yu AK, Merrill KD, Truong SN, Forward KM, Morse LS, Telander DG. The comparative histologic effects of subthreshold 532 nm and 810 nm diode micropulse laser on the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:2216–2224.
- Chidlow G, Shibebe O, Plunkett M, Casson RJ, Wood JPM. Glial cell and inflammatory responses to retinal laser treatment: comparison of a conventional photocoagulator and a novel, 3-nanosecond pulse laser. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:2319–2332.
- Wood JPM, Shibebe O, Plunkett M, Casson RJ, Chidlow G. Retinal damage profiles and neuronal effects of laser treatment: comparison of a conventional photocoagulator and a novel, 3-nanosecond pulse laser. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:2305–2318.
- Prince JH. *The Rabbit in Eye Research*. Springfield, IL: Charles Thomas Publisher; 1964.
- Koinzer S, Saeger M, Hesse C, Portz L, Kleemann S, Schlott K, Brinkmann R, Roider J. Correlation with OCT and histology of photocoagulation lesions in patients and rabbits. *Acta Ophthalmol* 2013; DOI: 10.1111/aos.12188
- Brinkmann R, Koinzer S, Schlott K, Ptaszynski L, Bever M, Baade A, Luft S, Miura Y, Roider J, Birngruber R. Real-time temperature determination during retinal photocoagulation on patients. *J Biomed Opt* 2012;17:061219.
- Koinzer S, Schlott K, Portz L, Ptaszynski L, Baade A, Bever M, Saeger M, Caliebe A, Denner R, Birngruber R, Brinkmann R, Roider J. Correlation of temperature rise and optical coherence tomography characteristics in patient retinal photocoagulation. *J Biophotonics* 2012;5:889–902.
- Birngruber R, Hillenkamp F, Gabel VP. Theoretical investigations of laser thermal retinal injury. *Health Phys* 1985;48:781–796.
- Luttrull JK, Dorin G. Subthreshold diode micropulse laser photocoagulation (SDM) as invisible retinal phototherapy for

- diabetic macular edema: A review. *Curr Diabetes Rev* 2012; 8:274–284.
31. Luttrull JK, Musch DC, Spink CA. Subthreshold diode micropulse panretinal photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy. *Eye* 2008;22:607–612.
 32. Gabel VP, Birngruber R, Lorenz B. Clinical relevance of a dosage device for laser photocoagulation. *Klin Monbl Augenheilkd* 1986;188:263–265.
 33. Denton ML, Noojin GD, Foltz MS, Clark CD III, Estlack LE, Rockwell BA, Thomas RJ. Spatially correlated microthermography maps threshold temperature in laser-induced damage. *J Biomed Opt* 2011;16:036003.
 34. Sramek C, Paulus Y, Nomoto H, Huie P, Brown J, Palanker D. Dynamics of retinal photocoagulation and rupture. *J Biomed Opt* 2009;14:034007.

Calibration of histological retina specimens after fixation in Margo's solution and paraffin embedding to in-vivo dimensions, using photography and optical coherence tomography

Stefan Koinzer · Sandra Bajorat · Carola Hesse ·
Amke Caliebe · Marco Bever · Ralf Brinkmann ·
Christoph Roecken · Johann Roider

Received: 13 March 2013 / Revised: 1 July 2013 / Accepted: 26 August 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract

Background The extent of retinal tissue deformation by histological processing needs to be separately measured for every workup protocol. This work presents a simple approach for its quantitative assessment, and shows lateral and axial scaling factors for a common protocol. We calibrated histological measurements by in-vivo photographic and optical coherence tomographic (OCT) measurements, using retinal photocoagulation lesions as calibration markers.

Methods We evaluated four rabbit eyes that were examined histologically after fixation in Margo's solution (1 % paraformaldehyde:1.25 % glutaraldehyde), isopropanol dehydration, paraffin embedding and hematoxylin and eosin staining. Distances between 51 pairs of laser lesions were compared in photographs and on histological slides. Retinal thickness mea-

surements were performed at 15 anatomically defined sites in these eyes, and related to anatomically matched OCT thickness measurements of six different rabbit eyes.

Results We found that the ratio of histological over photographic lesion distances was 1.17 (95 % CI 1.13–1.22), indicating 17 % lateral retinal stretching or expansion by the processing. Thickness measurements in histology were 65.6 % of the in-vivo thickness as measured in OCT, indicating 1/3 axial tissue compression or shrinkage.

Conclusions We provide an analysis of retinal tissue deformation after fixation in Margo's solution and paraffin embedding. In spite of protocol optimization for reduced tissue deformation, the workup caused 1/3 axial compression/shrinkage and 17 % lateral elongation, which was unexpected. We show a simple way how to calibrate retina specimens by

This research was conducted in a collaborative project which was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF). The authors have full control of all primary data, and they agree to allow Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology to review their data upon request.

S. Koinzer (✉) · S. Bajorat · C. Hesse · J. Roider
Department of Ophthalmology, University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Kiel, House 25, Arnold-Heller-Str. 3,
24105 Kiel, Germany
e-mail: koinzer@auge.uni-kiel.de

S. Bajorat
e-mail: sandra.thuete@gmx.de

C. Hesse
e-mail: carola.hesse@gmx.net

J. Roider
e-mail: roider@auge.uni-kiel.de

A. Caliebe
Institute of Medical Informatics and Statistics, University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Kiel, House 31, Arnold-Heller-Str. 3,
24105 Kiel, Germany
e-mail: caliebe@medinfo.uni-kiel.de

M. Bever · R. Brinkmann
Medical Laser Center Lübeck GmbH, Peter-Monnik-Weg 4,
23562 Lübeck, Germany

M. Bever
e-mail: m.bever@web.de

R. Brinkmann
e-mail: brinkmann@mll.uni-luebeck.de

fundus photography and OCT, two methods that are readily available to most ophthalmologists. Our findings underline the necessity to calibrate specimens prior to morphometry.

Keywords Morphometry · Histology · Deformation · Artifact · OCT · Optical coherence tomography · Retina · Rabbit

Introduction

Tissue samples are subject to significant deformation through histological processing, which may introduce measurement errors of up to 300 % if the specimens are not properly calibrated [1]. In the case of larger specimens, calibration is feasible to macroscopic measurements before processing. Very thin and fragile tissues such as retina, however, are not eligible for macroscopic measurements. The globe shape of the eye enhances the difficulties in such measurements. Consequently, calibration by in-situ measurements would be advantageous. We used fundus color photography for lateral and optical coherence tomography (OCT) for axial calibration of histological sections.

The retina is approximately 200 μm thick, depending on the species and the anatomical origin (Koinzer et al., in press in *Acta Ophthalmologica*). It contains primarily neuronal tissue. Under in-vivo conditions, three forces—osmotic pressure, active fluid shift through the underlying retinal pigment epithelium (RPE), and hydrostatic pressure—keep it attached [2]. Post mortem, the bulk of these forces, which depend on active metabolic processes, breaks down, which puts the retina at a high risk of detachment and destruction during the histological processing. Margo and Lee have systematically examined corneal clarity, tissue deformation, retinal attachment, and tissue preservation after whole-eye fixation through different fixatives, and suggested a mixture of 1 % of phosphate-buffered formaldehyde and 1.25 % glutaraldehyde (Margo's solution) [3]. To date, this fixative is widely used in ophthalmic pathology in cases where tissue samples are too large for plastic embedding.

In this rabbit study, we applied in-vivo color fundus photography for length calibration and optical coherence tomography (OCT) for thickness calibration of our specimens after they had been fixated in Margo's solution and processed for histology. Moderately intense laser lesions served as landmarks on the retina that could be localized in-vivo and in specimens as well, but did not attach the retina.

Material and methods

Our study had two independent arms, one including four eyes of two rabbits that underwent fundus photography and

histological processing, the other one including six eyes of three rabbits that were examined by OCT. Fundus photographs and histological images originated from identical animals, while thickness calibration was done by statistical correlation of anatomically matched OCT and histological measurements from different animals.

Animal treatment

We placed grids of 150–300 moderate laser burns on the retinas of chinchilla grey rabbits by conventional retinal photocoagulation, producing grey to white fundus lesions (Fig. 1). The animals were treated under general and local anesthesia, with dilated pupils. Laser irradiation was delivered through a modified Mainster focal grid laser contact lens which had been fitted onto the eye with methylcellulose gel (2 %). We performed photocoagulation with a slightly modified 532 nm continuous wave laser system (VISULAS VITE, Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany). The irradiation diameter was 133 μm on the fundus. Powers—and the resulting lesion intensities—were variable, and exposure times were 200 ms, or automatically controlled as published elsewhere [4, 5].

The rabbits were maintained in animal units at the University Medical Center of Schleswig–Holstein, and all animal experiments have been carried out according to the German law for protection of animals and approved by the Ministry of Energy Transition, Agriculture, the Environment, and Rural Areas of Schleswig–Holstein, Kiel, Germany (application no.

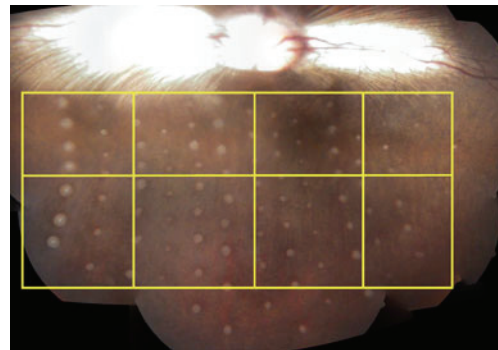


Fig. 1 Panoramic view of a rabbit fundus. Single photographs were digitally assembled by Hugin-software, ver. 2010.2.0 (www.hugin.sourceforge.net). At the upper edge, the optic papilla (middle), the big retinal vessels, and the medullary ray are displayed. The visual streak is located underneath the papilla and medullary ray. The natural appearance of a rabbit fundus is reddish to brown, depending on the pigment density in the underlying retinal pigment epithelium and choroid. Grey to white round spots with variable diameters are photocoagulation burns of variable intensities. *Yellow lines* show the rectangular pattern that we used for standardization of thickness measurement location. The *horizontal lines* run parallel to the medullary ray, and 1 mm, 3 mm, and 6 mm below it, and the *vertical lines* run through the optic papilla, the ends of the medullary ray and halfway in between. We measured the retinal thickness at the intersections of these lines ($n=15$) in each eye

V312-7234.121-11). The experiments followed the “Principles of laboratory animal care” (NIH publication No. 85-23, revised 1985), the OPRR Public Health Service Policy on the Humane Care and Use of Laboratory Animals (revised 1986), and the U.S. Animal Welfare Act, as amended.

Histological processing

Six hundred and forty-five photocoagulation lesions were applied to four eyes of two rabbits that underwent histological examination. Fundus photographs were recorded 1 h after each photocoagulation treatment with a Zeiss VISUCAM (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany). After enucleation, we fixated the eyes in Margo’s solution for 2 h, removed the anterior segments, and continued fixation in Margo’s solution for 1–2 days at room temperature. The area of interest was cut out of a retina–choroid–sclera preparation, marked with color, dehydrated in increasing isopropanol concentrations at room temperature ($3 \times 70\%$ for 24 h, $1 \times 80\%$ for 8 h, $1 \times 90\%$ over night, $3 \times 100\%$ for 8 h), infiltrated and embedded in paraffin at its melting temperature of 56°C ($1:1$ isopropanol:paraffin mixture for 90 min, $3 \times 100\%$ paraffin for 24 h, then blocked in paraffin and cooled). Then we cut the cooled block ($\sim 0^\circ\text{C}$) slowly into $5\ \mu\text{m}$ slices at $50\ \mu\text{m}$ distances and stained the sections with hematoxylin and eosin. Stronger photocoagulation lesions, color marks, the optic nerve, and the spatial relation of lesions were used to identify laser lesions within the specimens and correlate them to fundus photographs. We localized 508 of 645 lesions in histological sections. One hundred and thirty-seven lesions could not be localized because the irradiation power had been too low, because lesions had healed or because of tissue destruction during the processing.

Fundus image calibration

In order to assess the scale of digital fundus photographs, we had applied calibration lesions with an irradiated fundus diameter of $333\ \mu\text{m}$ in preliminary experiments on nine rabbits. The lesions had been applied adjacent to each other, producing center-to-center distances that lay 1 lesion diameter apart. Five lesions were applied in a cross-pattern as shown in Fig. 2, allowing to measure the distance of 2 lesion diameters in x - and y -direction each. We found a pixel-to-micrometer ratio of $9.5 \pm 0.7\ \mu\text{m}/\text{pixel}$, equally on horizontal and vertical scales and comparable scalings, independently of the animal used.

Retinal length calibration

Lesion diameters could not be used for measurement calibration, because lesions are not sharply displayed. To calibrate retinal length deformation, we identified pairs of photocoagulation lesions that were visible in one histological section and

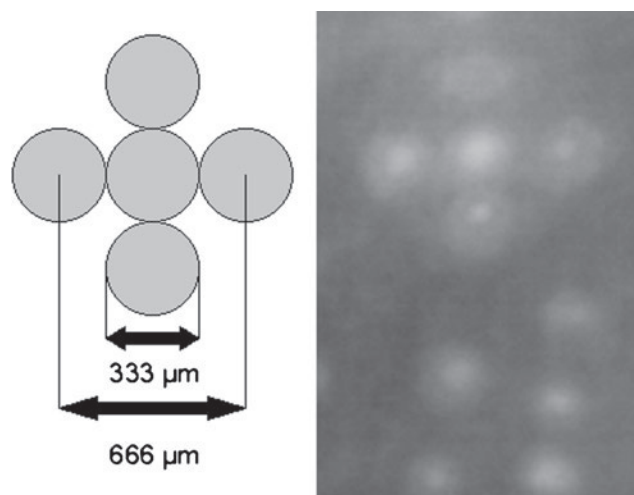


Fig. 2 Illustration of photographic image calibration. Schematic drawing on the left, photographic image on the right. We applied five laser lesions in a cross-pattern, with each lesion having a diameter of $333\ \mu\text{m}$ on the fundus. We used center-to-center distances for length measurements, because the outline of a lesion is not sharply displayed (*right*), and because the size of the retinal whitening depends on the burn intensity. The cross-pattern of lesions facilitated 2-dimensional photo calibration by a double center-to-center distance of $666\ \mu\text{m}$ in each axis

measured center-to-center distances. These were correlated to the distances of the same lesion pairs on photographic fundus images.

A total of 51 lesion pairs were identified and measured in histological sections and on fundus images as well. They were taken from all four rabbit eyes (see Table 1).

Retinal thickness calibration

The retinal thickness varies according to its anatomical location. In the rabbit eye, the optic nerve enters the eye above the optical center. To the left and right of the optic papilla, a horizontally extended area of myelinated nerve fibres called “medullary ray” appears white in the fundus image (Fig. 1). Here, the nerve fibre layer of the inner retina is particularly thick. Below the medullary ray lies an area of maximal retinal sensitivity which is called “visual streak”, and where the retina

Table 1 Distance ratio of identical laser lesion pairs in histological slides and fundus photographs (mean \pm standard deviation). Data are displayed for each of the four study eyes separately. Below, the values for all four eyes and the 95 % confidence interval (CI) are given

Rabbit no.	Eye	Ratio histology/photo (mean \pm SD)	N
1	1	1.18 ± 0.07	13
	2	1.16 ± 0.19	16
2	1	1.17 ± 0.16	14
	2	1.17 ± 0.22	8
	All	1.17 ± 0.16 (95 % CI : 1.13–1.22)	51

is thickened. Aside from the visual streak, retinal thickness decreases with increasing eccentricity, i.e., increasing distance from the optic papilla [6].

As laser-treated retina deforms differently than healthy retina (Koinzer et al., in press in *Acta Ophthalmologica*), we chose spots of healthy retina for thickness measurements. In order to compensate for anatomical thickness variations, we measured thicknesses at the corners of a standardized rectangular pattern on the fundus as shown in Figs. 1 and 3. The rectangles were separated by vertical lines through the optic papilla, the left and right end of the medullary ray, and halfway between these lines. Horizontal borders of the rectangles ran parallel to the medullary ray at 1 mm, 3 mm, and 6 mm distance below it.

Figure 3 shows a representative OCT image that we used for in-vivo thickness measurements. We applied a spectral-domain OCT (HRA + OCT Spectralis®, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany) and scanned the area of interest at 30- μ m steps. Every sectional image was obtained by averaging of 20 sweeps to optimize image quality. Along with the OCT sectional images, the OCT machine records a calibrated infrared (IR) image of the ocular fundus that serves as a locator. We used the IR image to find and mark the corners

of the rectangular pattern as indicated in Fig. 3. The retinal thickness was measured with the proprietary software of the OCT machine. We used sectional images that were displayed in the 1:1 μ m mode and magnified 8-fold for the measurement.

In histological specimens, the optic papilla/optic nerve and end of the medullary ray were used to find the horizontal positions for thickness measurements, i.e., the correct slides in a consecutive series. The distances of 1, 3, and 6 mm below the medullary ray were measured in the specimens, and the retinal thickness determined from the innermost ganglion layer to the outermost retinal pigment epithelium (RPE) layer.

Statistical analyses

We calculated means, standard deviations, and the 95 % confidence interval of the mean of the histological/photographic distance ratios. The influence of the individual eye on this ratio was analysed by a one-way ANOVA.

For the analysis of retinal thickness, the influence of location (lateral and vertical eccentricity) was tested by an ANOVA analysis with eye as an additional random factor, followed by a Scheffé post-hoc analysis. An ANOVA for repeated measurements was applied to test for the measurement method (OCT

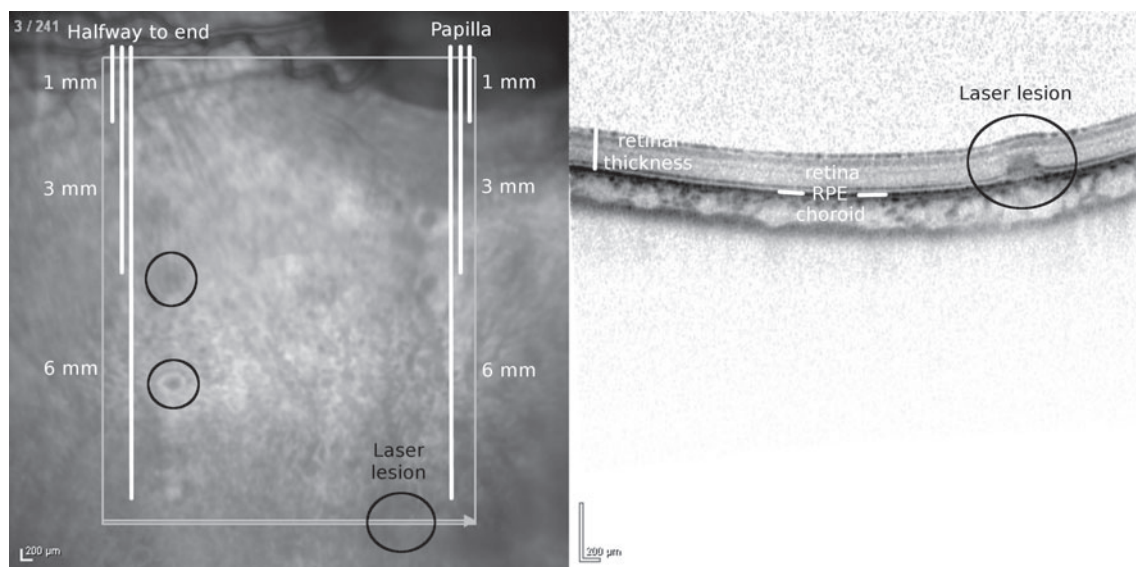


Fig. 3 An image generated by our spectral-domain OCT device. The *left* shows an infrared image (IR) of the fundus, with the optic papilla in the *upper right corner* and the right part of the medullary ray and the large vessels at the *upper left border*. The *right part of the figure* shows one individual sectional OCT image. Note that the scale of the sectional image is 4 times greater in vertical than in horizontal direction due to differential resolutions of the device ("1:1 pixel" mode), giving the image a distorted appearance compared to histology slides. A *light gray box* in the left image shows the area which was covered by the OCT scans. The *light gray arrow* at the lower border demarcates the position and direction of the actual scan shown on the right, and the *small number in the very left upper corner* indicates that this is section no. 3 in a series of 241. We scanned the area at 30 μ m steps. *Black circles* indicate some of the laser

lesions. The lower right lesion in the IR image is the same as that displayed in the section. *White annotations* indicate how retina thickness measurements were performed. In the IR image, two horizontal positions of measurement are visible (optic papilla and halfway of papilla to right end of medullary ray). *White lines* show how the locations for retinal thickness measurements were found below these two horizontal positions at 1, 3, and 6 mm distances from the medullary ray. In the sectional image, the choroid, retina, and retinal pigment epithelium (RPE) are labelled. The RPE is the outermost cellular layer of the retina. A *vertical white line* shows the distance we assessed as retinal thickness, including the ganglion cell and nerve fibre layers as inner limit and the RPE as outer limit. Even though the IR image appears a little blurred, distances in OCT sections are clearly recognizable

vs histology; between subjects factor) as well as location (two within subjects factors) with and without interaction.

P-values below 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were carried out with SPSS software, version 20.

Results

Length deformation in histological slides (Table 1)

The ratio of histological lesion pair distances over photographic lesion pair distances of identical pairs is given in Table 1 for each rabbit eye separately and for all eyes. The length ratios showed good accordance between the eyes, and were not significantly different ($p=0.99$). The overall mean ratio was 1.17 (range 0.81–1.55), with a 95 % confidence interval of 1.13–1.22. Obviously, the retina was stretched or expanded laterally by about 17 % on histological slides.

Influence of individual eye and anatomical location on retinal thickness (Figs. 4 and 5)

The influence of the eye side (right vs left) on the retinal thickness was neither significant in OCT ($p=0.56$) nor in histology ($p=0.27$). The retinal thickness was significantly different in different eyes ($p<0.001$). Two homogenous subgroups were differentiated by the Scheffé analysis, one

comprising three eyes with histological measurements (Fig. 4), the other one all six eyes with OCT measurements. The remaining eye (“Histo1”) was not statistically attributable to either group.

The influence of lateral eccentricity on retinal thickness measurements (optic papilla, halfway to end of medullary ray, and end of medullary ray) was significant neither in OCT ($p=0.38$) nor in histology ($p=0.94$), nor in the overall evaluation ($p=0.86$, Fig. 5a). The influence of vertical eccentricity was significant in OCT ($p<0.001$), in histological measurements ($p=0.01$), and in the overall evaluation ($p<0.001$, Fig. 5b). The Scheffé post-hoc analysis showed that the subgroups 1 and 3 mm below the medullary ray were homogenous, but the measurements 6 mm below the medullary ray were significantly different from the other groups ($p<0.001$).

In the multiple analysis with both lateral and vertical eccentricity as influence variables, only vertical eccentricity ($p<0.001$) showed a significant effect on the retinal thickness.

Comparison of retinal thickness in OCT images and histological slides

An ANOVA analysis with repeated measurements showed that the retinal thicknesses differed highly significantly in OCT images (mean \pm SD, 160.7 \pm 13.3 μ m) and in histology (105.4 \pm 17.3 μ m, $p<0.001$). The ratio of mean values was 105.4 / 160.7=65.6 %, indicating retinal shrinkage by 1/3 by the histological processing. No significant interaction between

Fig. 4 Box plots of retinal thickness measurements in all ten rabbit eyes of the study

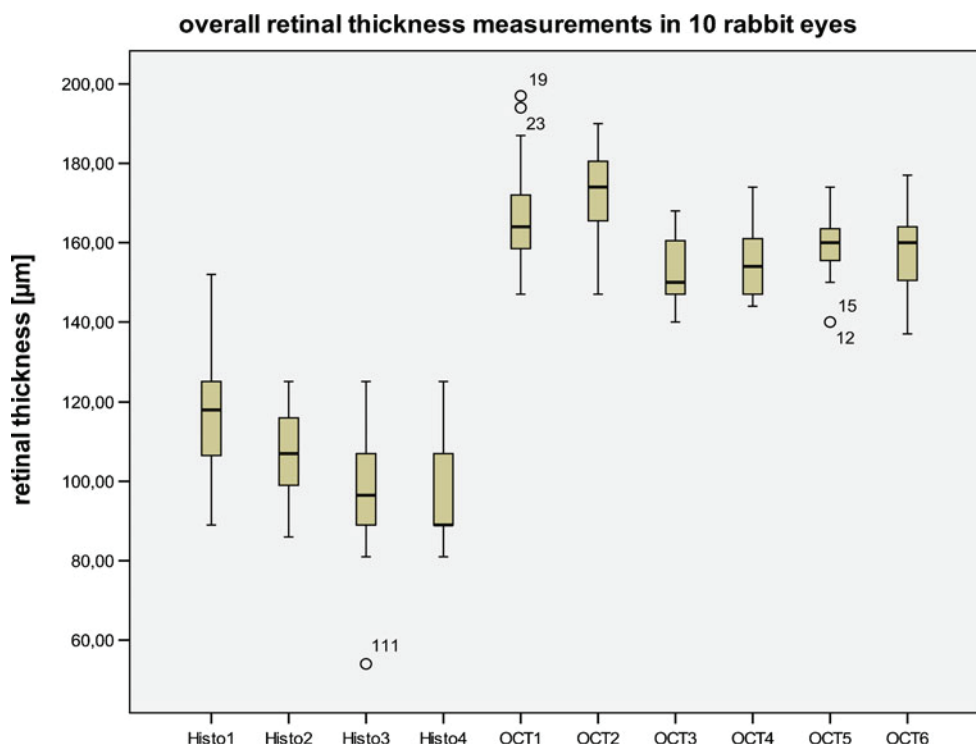
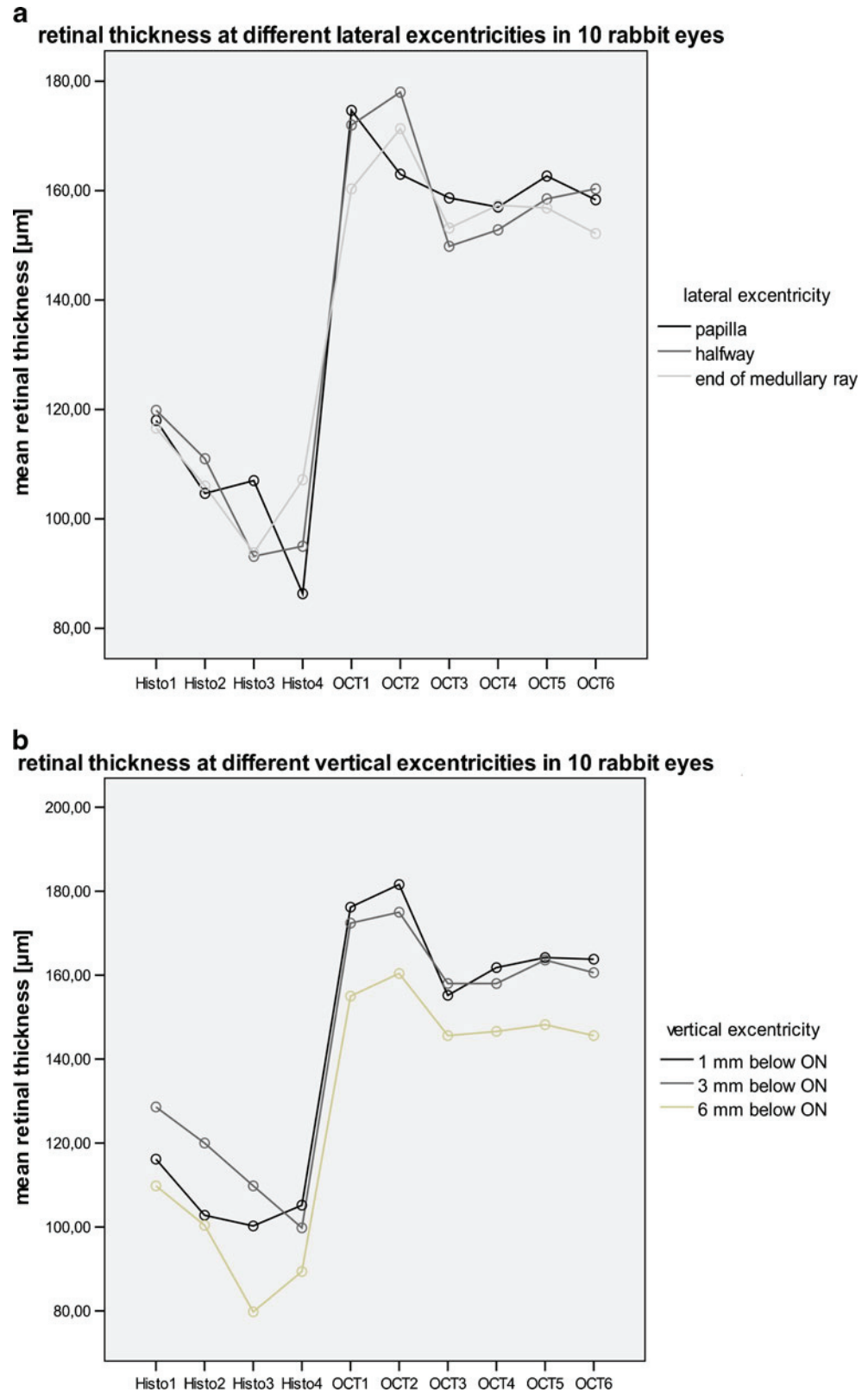


Fig. 5 a and b: Influence of anatomical location on the retinal thickness measurement in OCT images. **a** Mean values of retinal thickness measurements at different lateral eccentricities (optic papilla [black], end of medullary ray [light grey], middle in between both [intermediate grey]). **b** Mean values of retinal thickness measurements at different vertical eccentricities (1 mm [black], 3 mm [intermediate grey] or 6 mm [light grey] below the medullary ray). ON: optic nerve



vertical eccentricity and the method of measurement was found.

A digital photographic simulation of the retinal tissue deformation is shown in Fig. 6.

Discussion

In this study, we investigated retinal tissue deformation after a common histological workup protocol that uses Margo's

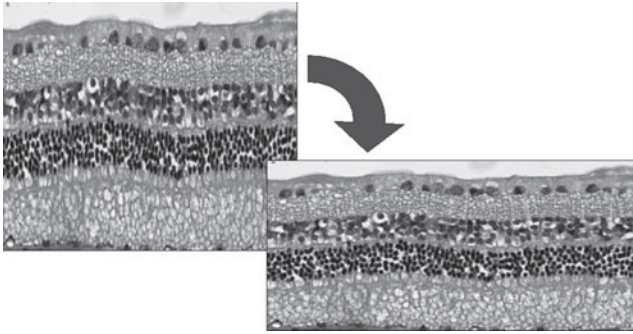


Fig. 6 Dimensions of a piece of retina prior to and after histological processing are digitally simulated, with original dimensions being simulated in the *top left image* and histological dimensions in the *lower right image*. By histological processing according to the protocol we used, the retina shrinks or is compressed axially by about 1/3 and expands or is stretched laterally by about 17 %

solution as fixative for paraffin embedding. In-vivo OCT images served as retinal thickness reference. Thickness calibration was performed on 15 measurements each from four eyes for histology (60 measurements), and from six eyes for OCT (90 measurements). For retinal length correction, we used top view photographs of the tissue that we calibrated in relation to laser lesions of defined center-to-center-distances. We measured and correlated 51 distances of laser lesion pairs in photographs and on histological slides. Our analysis revealed about 17 % lateral expansion or stretching of the retina and about 1/3 vertical shrinkage or compression, respectively.

The retina is dominated by neuronal tissue, and contains about 84 % water [7] and little collagen. Due to its high protein content, it is better fixated with glutaraldehyde than formalin. The underlying choroid is dominated by vascular tissue, while the sclera is dominated by collagen fibres (50–75 %) and contains about 68 % water [8]. It is reasonable to assume that the underlying tissues react to processing chemicals differently than retina. This implicates that a retinal pathology may be located alongside the corresponding choroidal location in a histological specimen, and in fact a lateral shift of slightly detached retina or lateral traction of attached retina may be frequently observed at photocoagulation lesions [9, 10]. Histological analyses of chorio-retinal interactions should consider that.

Tissue deformation through histological processing has been thoroughly examined over decades in numerous tissue types such as liver [11], kidney [12], lung [13], and others. Recently, differential tissue shrinkage in the *z*-axis has been discovered in the context of 3-dimensional particle counting by the optical dissector, and two extensive studies have proposed feasible methods for differential *z*-axis calibration [14, 15]. The method relies on particle count percentiles in different tissue layers, and is applicable to thick sections of homogenous tissue, but not on thin tissue layers of variable differentiations.

If thin, layered structures are to be calibrated, OCT is a useful tool, which is also applicable and commercially available for ex-vivo microscopy [16, 17], and which is increasingly applied in other medical specializations than ophthalmology such as dermatology [18], cardiology [19], and others.

Retinal OCT-to-histological layer analyses have been done on plastic embedded sections by Knott et al. [20], where the retinal thickness was merely the same in OCT and histology. In that study on murine eyes, the optic nerve width was used to calibrate OCT images according to histological measurements, which might be an explanation for the high agreement of both measurements. Another study compared retinal thicknesses in primate eyes after plastic embedding, and found about 1/3 axial shrinkage, which agrees with our findings from paraffin histology [21]. A recent study by Curcio et al. compared retinal OCT and histology of the human macula [22]. They used a modified workup protocol for electron microscopy, which led to a retinal thickness reduction as well. The authors calculated a median tissue volume decrease of 14.5 % overall, and of 29 % in the fovea, through the processing. Others found volume changes by as much as 40–50 % through the processing [21, 23].

In contrast to the cited studies, we calibrated specimens for lateral deformation as well. It has been shown before that axial and lateral deformation do not necessarily correlate [24]. Using photocoagulation lesions, we found 17 % lateral elongation of the retina. It is unlikely that the laser lesions themselves influenced this value significantly. Strong lesions may induce fibrous scars that span Bruch's membrane. In these cases, photocoagulation attaches the retina to the underlying tissue ("retinopexy"). In lesions where Bruch's membrane remains intact, such as those applied in our study, however, the retina will rather split or detach completely and move sideways, as may be observed in many histological images from photocoagulation lesions [9, 10].

Tissue deformation occurs during fixation — collagen fibres swell in low formaldehyde concentrations — and depends on the fixation agent and its osmolality. Higher fixation agent osmolality causes increasing tissue shrinkage. To minimize these effects, we used the fixative suggested by Margo and Lee, which minimized ocular tissue deformation [3]. Furthermore, dehydration tends to cause tissue shrinkage, and embedding and cutting cause further deformation. Cutting may indeed cause compression in the cutting direction, and this effect increases with decreasing section thickness [24]. The correction factor for this compression was in the order of 0.9 to 0.952 in lung tissue, and is neglected by some authors [1]. In our processing protocol, the blade ran from the retinal side toward the sclera in order to prevent artificial retinal detachment, and the shrinkage (or compression) factor was 0.656. The study design does not make it possible to differentiate compression by the blade from shrinkage by processing chemicals. In order to minimize mechanical compression,

we cooled the paraffin block to 0 °C during cutting. Plastic embedding is thought to prevent compression even more effectively, but has allowed the same amount of compression or shrinkage that we found [21].

The magnification factor that we applied to calculate the laser beam diameter in rabbit eyes (0.66) represents a possible source of error. The rabbit eye has a total refractive power of 100 D, vs 60 D in humans, and the axial length in female pigmented adult rabbits is 15.5 mm, vs 24.5 mm in humans [27, 28]. The factor of 0.66 was based on our own calculations, and is confirmed by other authors as well [25, 26]. It includes laser beam diminuation by the optics of the rabbit eye and magnification by the contact lens ($\times 1.05$). A selected laser beam diameter of 200 μm resulted in an irradiated retina diameter of 133 μm , and a selected 500 μm beam resulted in an irradiated diameter of 333 μm . Alternatively, instead of calibrating photographic in-vivo images, direct (photographic) measurements could have been conducted on rabbit eyes after enucleation and removal of the anterior segments. This approach would have introduced different sources of error such as fixation, which we began prior to opening the globes, and measurement on a flat photographic image of a spherical structure. We assume that the in-vivo measurements that we performed on calibrated images come closer to reality.

It is a limitation of our study design that we assessed OCT and histological retinal thicknesses in different animals. Although measurement of both in the same animal may be advantageous, our statistical post-hoc analysis revealed that the retinal thickness was only significantly influenced by the vertical eccentricity (significantly thinner 6 mm below the medullary ray) and by the assessment method — OCT vs histology.

In summary, we provide an analysis of retinal tissue deformation by a commonly used histological workup protocol, which uses Margo's solution as fixative. In spite of its optimization for reduced tissue deformation, the workup caused 1/3 axial compression/shrinkage and 17 % lateral stretching/expansion, which was unexpected. As the actual values depend on many factors and cannot be transferred to specimens from other laboratories, we show a simple way how to calibrate retina specimens by fundus photography and OCT, two methods that are readily available to most ophthalmologists. Our findings underline the necessity to calibrate specimens prior to morphometry.

Acknowledgements The authors declare that they have no conflict of interest.

The data were presented at the following conference:

- Annual meeting of the German-speaking Ophthalmopathologists, Erlangen, Germany; October 26/27, 2012.

The authors gratefully acknowledge grant support for this collaborative research project by the German Ministry of Education and Research (BMBF) according to the Innovation Award for Advancing Medical Technology 2006, grant #01EZ0734 (Dept. of Ophthalmology,

University hospital of Schleswig-Holstein, Campus Kiel), #01EZ0732 (Medical Laser Center Lübeck), #01EZ0733 (Institute of Biomedical Optics Lübeck) and #01EZ0735 (Carl Zeiss Meditec AG).

Technical assistance by Monika Marquardt, Serap Luick, and Barbara Fluke is also gratefully acknowledged.

References

- Oberholzer M (1983) *Morphometrie in der klinischen Pathologie. Allgemeine Grundlagen*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Quintyn JC, Brasseur G (2004) Subretinal fluid in primary rhegmatogenous retinal detachment: physiopathology and composition. *Surv Ophthalmol* 49:96–108
- Margo CE, Lee A (1995) Fixation of whole eyes: the role of fixative osmolarity in the production of tissue artifact. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 233:366–370
- Koinzer S, Schlott K, Ptaszynski L, Bever M, Kleemann S, Saeger M, Baade A, Caliebe A, Miura Y, Birngruber R, Brinkmann R, Roider J (2012) Temperature-controlled retinal photocoagulation — a step toward automated laser treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:3605–3614
- Schlott K, Koinzer S, Ptaszynski L, Bever M, Baade A, Roider J, Birngruber R, Brinkmann R (2012) Automatic temperature-controlled retinal photocoagulation. *J Biomed Opt* 17:061223
- Prince JH (1964) *The rabbit in eye research*. Charles Thomas, Springfield
- Stefánsson E, Wilson CA, Lightman SL, Kuwabara T, Palestine AG, Wagner HG (1987) Quantitative measurements of retinal edema by specific gravity determinations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:1281–1289
- Watson PG, Young RD (2004) Scleral structure, organisation and disease. A review. *Exp Eye Res* 78:609–623
- Yu AK, Merrill KD, Truong SN, Forward KM, Morse LS, Telander DG (2013) The comparative histologic effects of subthreshold 532 nm and 810 nm diode micropulse laser on the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(3):2216–2224. doi:10.1167/iov.12-11382
- Hoerster R, Muether PS, Vierkotten S, Schröder S, Kirchhof B, Fauser S (2012) In-vivo and ex-vivo characterization of laser-induced choroidal neovascularization variability in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 250:1579–1586
- Bahr GF, Bloom G, Friberg U (1957) Volume changes of tissues in physiological fluids during fixation in osmium tetroxide or formaldehyde and during subsequent treatment. *Exp Cell Res* 12:342–355
- Davies DJ, Brewer DB, Hardwicke J (1978) Urinary proteins and glomerular morphometry in protein overload proteinuria. *Lab Invest* 38:232–243
- Weibel ER (1979) Morphometry of the human lung: the state of the art after two decades. *Bull Eur Physiopathol Respir* 15:999–1013
- Hatton WJ, von Bartheld CS (1999) Analysis of cell death in the trochlear nucleus of the chick embryo: calibration of the optical disector counting method reveals systematic bias. *J Comp Neurol* 409:169–186
- Gardella D, Hatton WJ, Rind HB, Rosen GD, von Bartheld CS (2003) Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections. *J Neurosci Meth* 124:45–59
- Li Q, Onozato ML, Andrews PM, Chen CW, Paek A, Naphas R, Yuan S, Jiang J, Cable A, Chen Y (2009) Automated quantification of microstructural dimensions of the human kidney using optical coherence tomography (OCT). *Opt Express* 17:16000–16016
- Mujat M, Greco K, Galbally-Kinney KL, Hammer DX, Ferguson RD, Iftimia N, Mulhall P, Sharma P, Pikal MJ, Kessler WJ (2012)

- Optical coherence tomography-based freeze-drying microscopy. *Biomed Opt Express* 3:55–63
18. Gambichler T, Jaedicke V, Terras S (2011) Optical coherence tomography in dermatology: technical and clinical aspects. *Arch Dermatol Res* 303:457–473
19. Regar E, Ligthart J, Bruining N, van Soest G (2011) The diagnostic value of intracoronary optical coherence tomography. *Herz* 36:417–429
20. Knott EJ, Sheets KG, Zhou Y, Gordon WC, Bazan NG (2011) Spatial correlation of mouse photoreceptor–RPE thickness between SD-OCT and histology. *Exp Eye Res* 92:155–160
21. Anger EM, Unterhuber A, Hermann B, Sattmann H, Schubert C, Morgan JE, Cowey A, Ahnelt PK, Drexler W (2004) Ultrahigh resolution optical coherence tomography of the monkey fovea. Identification of retinal sublayers by correlation with semithin histology sections. *Exp Eye Res* 78:1117–1125
22. Curcio CA, Messinger JD, Sloan KR, Mitra A, McGwin G, Spaide RF (2011) Human chorioretinal layer thicknesses measured in macula-wide, high-resolution histologic sections. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:3943–3954
23. Abbott CJ, McBrien NA, Grünert U, Pianta MJ (2009) Relationship of the optical coherence tomography signal to underlying retinal histology in the tree shrew (*Tupaia belangeri*). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:414–423
24. Baur R (1969) Error correction by stereologic measuring on human placenta. 2. Cutting compression. *Experientia* 25:1173
25. Paulus YM, Jain A, Gariano RF, Stanzel BV, Marmor M, Blumenkranz MS, Palanker D (2008) Healing of retinal photocoagulation lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:5540–5545
26. Birngruber R (1991) Choroidal circulation and heat convection at the fundus of the eye. In: Wolbarsht ML (ed) *Laser applications in medicine and biology*. Plenum Press, New York, pp 277–358
27. Verolino M, Nastri G, Sellitti L, Costagliola C (1999) Axial length increase in lid-sutured rabbits. *Surv Ophthalmol* 44(Suppl 1):103–108
28. Park HS, Kim JY, Shin JP, Choi YJ, Kim SY (2005) Effect of experimental scleral shortening on axial length of the rabbit eye. *Korean J Ophthalmol* 19:101–205

Temperature-Controlled Retinal Photocoagulation Reliably Generates Uniform Subvisible, Mild, or Moderate Lesions

Stefan Koinzer¹✉, Alexander Baade²✉, Kerstin Schlott²✉, Carola Hesse¹✉, Amke Caliebe³✉, Johann Roeder¹✉, and Ralf Brinkmann²✉

¹ Department of Ophthalmology, University hospital of Schleswig-Holstein, Kiel, Germany

² Medical Laser Centre Lübeck GmbH, Lübeck, Germany

³ Institute of Medical Informatics and Statistics, University hospital of Schleswig-Holstein, Kiel, Germany

Correspondence: Stefan Koinzer, Department of Ophthalmology, University hospital of Schleswig-Holstein, Campus Kiel, House 25, Arnold-Heller-Str. 3, 24105 Kiel, Germany. e-mail: koinzer@auge.uni-kiel.de

Received: 10 April 2014

Accepted: 21 July 2015

Published: 6 October 2015

Keywords: spectral domain; OCT; laser photocoagulation; optoacoustics; real-time temperature measurement; animal model; subvisible

Citation: Koinzer S, Baade A, Schlott K, et al. Temperature-controlled retinal photocoagulation reliably generates uniform subvisible, mild, or moderate lesions. 2015;4(5):9, doi: 10.1167/tvst.4.5.9

Purpose: Conventional retinal photocoagulation produces irregular lesions and does not allow reliable control of ophthalmoscopically invisible lesions. We applied automatically controlled retinal photocoagulation, which allows to apply uniform lesions without titration, and aimed at five different predictable lesion intensities in a study on rabbit eyes.

Methods: A conventional 532-nm photocoagulation laser was used in combination with a pulsed probe laser. They facilitated real-time fundus temperature measurements and automatic exposure time control for different predefined time/temperature dependent characteristics (TTC). We applied 225 control lesions (exposure time 200 ms) and 794 TTC lesions (5 intensities, exposure times 7–800 ms) in six rabbit eyes with variable laser power (20–66.4 mW). Starting after 2 hours, we examined fundus color and optical coherence tomographic (OCT) images over 3 months and classified lesion morphologies according to a seven-stage OCT classifier.

Results: Visibility rates in funduscopy (OCT) after 2 hours were 17% (68%) for TTC intensity group 1, 38% (90%) for TTC group 2 and greater than 94% (>98%) for all consecutive groups. TTC groups 1 through 4 correlated to increasing morphological lesion intensities and increasing median funduscopy and OCT diameters. Group 5 lesions were as large as, but more intense than group 4 lesions.

Conclusions: Automatic, temperature controlled photocoagulation allows to apply predictable subvisible, mild, or moderate lesions without manual power titration.

Translational Relevance: The technique will facilitate standardized, automatically controlled low and early treatment of diabetic retinopathy study (ETDRS) intensity photocoagulation independently of the treating physician, the treated eye and lesion location.

Introduction

Retinal laser photocoagulation can preserve or even improve vision in spite of its tissue-destructive nature.^{1,2} Even today, in the era of vascular endothelial growth factor blocking intravitreal injections, laser photocoagulation remains the standard treatment of peripheral ischemic retinal conditions, such as severe diabetic retinopathy, retinal vein occlusion and others, and a second-line or adjunctive treatment of diabetic macular edema.³

Much effort has been undertaken recently to minimize side effects like pain, scotoma formation,

and others through softer lesions.⁴ One approach uses selective retina therapy (SRT), which aims at thermomechanical selective disruption of retinal pigment epithelial (RPE) cells. SRT induces a wound healing reaction in the RPE, thus improves metabolism at the chorioretinal junction and “rejuvenates” the RPE.^{5–7} Various other innovations like micropulse lasers⁸ or short exposure continuous wave (CW) lasers⁹ are capable to induce arbitrary mild damage in the retinal tissue or merely stimulate it thermally at a cell-preserving intensity level. Pilot studies have collected evidence that subvisible treatment and SRT are clinically effective.^{8,10–13} The term subvisible is

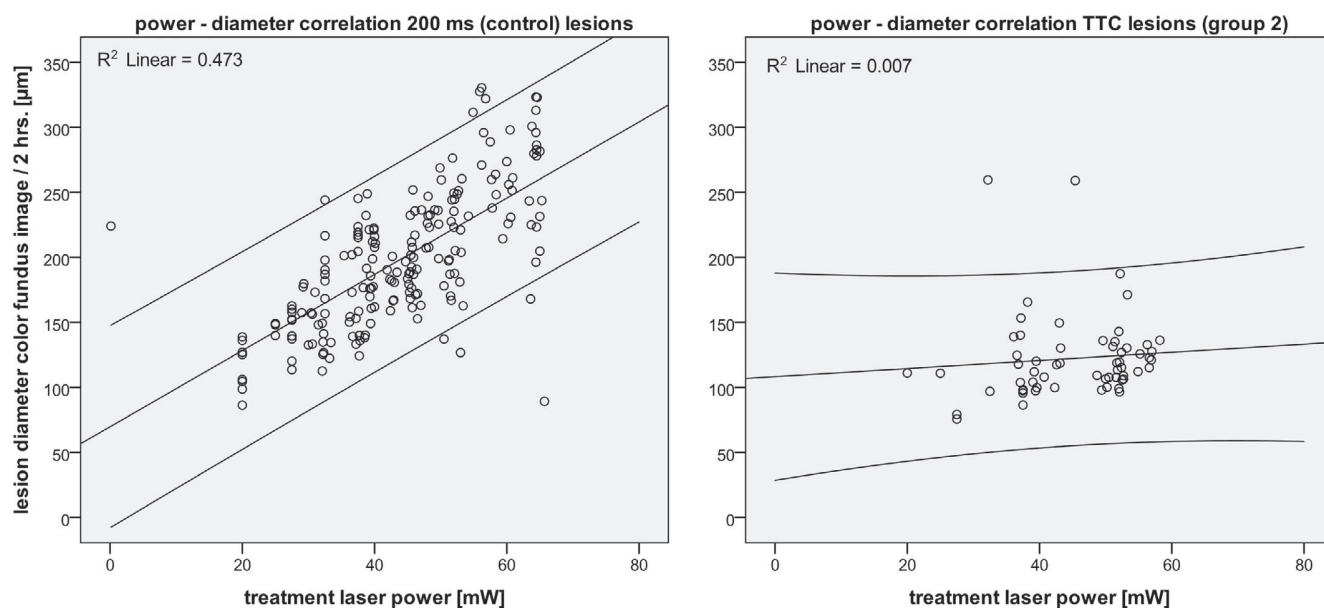


Figure 1. The linear correlations of treatment laser power with ophthalmoscopic diameter review the advantage of automatically controlled TTC photocoagulation.^{18,19} In standard, 200 ms lesions, the lesion diameters grows linearly with power ($R^2 = 0.5$, *left*), while this correlation is lost in TTC lesions ($R^2 = 0.0$, *right*, here for TTC subgroup two lesions of the present study). As TTC lesions are independent of power, they will not require power titration in a clinical setting and be uniform throughout patients and fundus locations, largely irrespective of local pigmentation and transmission. The *black lines* show the linear regressions (*middle*) and 95% CI's for prediction.

commonly applied for lesions that are at least ophthalmoscopically invisible during the treatment. Due to inter- and intraindividual variation of light transmission, light absorption, and tissue sensitivity, the biological effect of a laser irradiation cannot be predicted from laser parameters alone, such as power, irradiation time, and irradiation diameter. Effective control of the biological tissue effect has remained a key challenge in modern photocoagulation.^{9,14}

We have recently introduced fundus temperature measurement during photocoagulation.^{15–17} Based on temperature measurements, we implemented automatic exposure time control that produces homogeneous lesions widely independently of laser power or local absorption, respectively.^{18,19} The treatment device measures fundus temperature increments non-invasively in real-time with 1-kHz sampling rate and stops the treatment laser, when a predefined time-temperature characteristic (TTC) criterion is achieved. While in standard lesions with fixed exposure time, the ophthalmoscopic lesion diameter grows linearly with laser power, automatically TTC controlled lesions lose the correlation of power and lesion diameter (Fig. 1). They do not require titration and will be uniform throughout fundus locations, irrespective of fundus pigmentation, and patients. The

resulting lesions of the previous study were barely visible with a diameter equal to the irradiation beam.¹⁹

In the current study, we investigated modifications of the TTC criterion, in order to reliably generate photocoagulation lesions of different clinically desired, predictable intensities. Five different TTC intensities were evaluated in order to define adequate TTC criteria for subvisible and early treatment of diabetic retinopathy study (ETDRS)^{20,21} intensity treatments.

Materials and Methods

Animal Photocoagulation Study

We applied 1022 lesions in six eyes of three chinchilla gray rabbits. The animals were treated under general and local anesthesia, with dilated pupils. A modified Mainster focal grid laser contact lens was fitted onto the eye with methylcellulose gel (2%) and mechanically fixed in its position. We performed photocoagulation with a 532-nm continuous wave (CW) laser system (VISULAS 532s; Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany).

The irradiation diameter was 133 μm on the rabbit

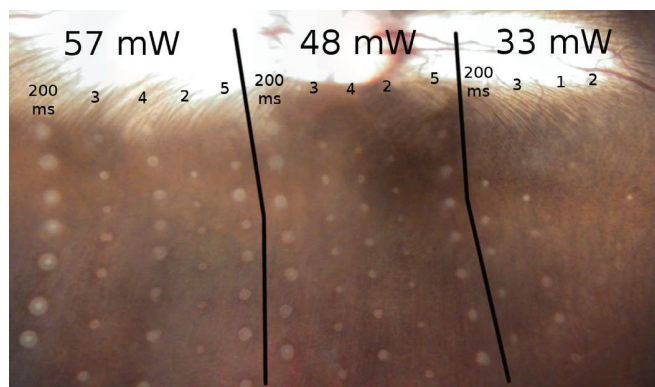


Figure 2. One representative rabbit fundus panorama, which was digitally assembled from several photographs taken 2 hours after laser treatment. Five columns on the left were applied with 55 mW, the following five columns were applied with 48 mW, and the four columns on the right were applied with 33 mW. Exposure times were 200 ms in the 1st, 6th, and 11th columns, and automatically controlled for different TTC intensities (1–5) in the rest. Thirty-three milliwatt power was not sufficient to achieve group 4 or 5 lesions within the maximum exposure time, while 48 and 55 mW powers were too high to achieve group 1 lesions even in the shortest possible exposure time. Therefore, not all TTC groups were applied with every power setting.

fundus. Exposure times were 200 ms or variable, automatically controlled for five different TTC intensities. For 200 ms standard irradiations, we adjusted laser power in order to achieve ophthalmoscopically visible lesions of various intensities, but no ruptures or bleedings. Next to a column of 200 ms lesions, we applied columns of different intensity TTC lesions using the same power setting. TTC exposure time control is limited to a certain ideal exposure time window¹⁹ that we defined to be 10 to 800 ms in the present study. Only those TTC groups were applied that were likely to achieve the intended intensity within 10 to 800 ms. Figure 2 shows a fundus image after one of the experiments. The figure has been digitally assembled from several single images using Hugin software version 2010.2.0 (www.hugin.sourceforge.net).

The rabbits were maintained in animal units at the University Medical Centre of Schleswig-Holstein, and all animal experiments were performed according to the German law for protection of animals and approved by the Ministry of Energy Transition, Agriculture, Environment and Rural Areas of Schleswig-Holstein, Kiel, Germany (application no. V312-7234.121-11). All experiments adhered to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

Fundus Temperature Measurement

We measured the fundus temperature profile during treatment laser irradiation in real-time and noninvasively on the basis of optoacoustics as published before.^{15–17,22} In short, we superimposed a pulsed 523-nm laser (75 ns pulses, 3–8 μ J; QG-523-1000; Crysta-Laser LC, Reno, NY), collinearly and coaxially to the treatment irradiation. The pulses were emitted at a repetition rate of 1 kHz and caused short, innocuous temperature increments within the irradiated tissue that induced short, reversible thermoelastic tissue expansions. The amplitude of these expansions depends on the tissue temperature. Tissue expansions cause ultrasonic pressure waves that propagate through the eye, and these were detected by an embedded transducer in the custom made, modified contact lens (Mod. Mainster OMRA-S, Ocular Instruments, Bellevue, WA, modified by Medical Laser Centre Lübeck GmbH). Its signals were digitally processed and recorded via a digital/analog transducer card in a personal computer. The signal profile reflects relative changes of the average tissue temperature within the probed tissue volume. “Tissue volume” refers to all tissue layers that are traversed by the light beam with a given diameter and that absorb irradiation, such as RPE, pigmented choroid, and to a lesser extent retina, choriocapillaris, and others. By solving the heat diffusion equation, we calculated peak temperature in the lesion center at the RPE level.

Automatic Exposure Time Control

Based on fundus temperature monitoring and processing in real time, the irradiation could be stopped as soon as the desired TTC criterion was met. Figure 3 shows schematically the strategy of the automatic switch-off algorithm for three differently pigmented fundus locations, in order to achieve uniform lesions.

The shutoff mechanism for subvisible or barely visible lesions is based on a characteristic curve that correlates the induced temperature over time with a certain lesion size. The characteristic curve for a 95% probability to create visible lesions of the desired size (expected dose 95/ED95) was determined previously.^{18,19} The characteristic curve was fitted using the damage integral from the Arrhenius theory, which describes the relationship between thermal denaturation of proteins over time and the temperature course,^{18,23} by stepwise time integration over the expected denaturation or damage, respectively. The

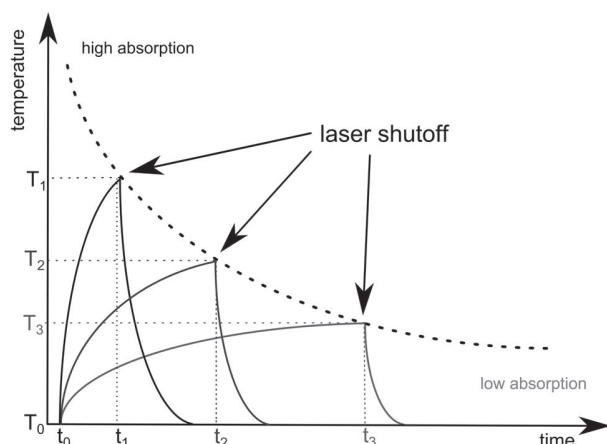


Figure 3. Schematic diagram of an arbitrary TTC curve. The Arrhenius theory supplies a mathematical model of the time-dependent tissue effect of a temperature increase, and served as a source for our empirically adapted TTC curves. All time-temperature combinations that meet one particular TTC curve will induce equal lesions. Short exposures require higher temperatures than long exposures in order to achieve an equal effect (if $T_1 > T_2$, then $t_1 < t_2$). Vertical transposition of the TTC plot allows modifying lesion intensities.

fit enabled us to calculate the ED95 temperature thresholds for arbitrary exposure times.

For stronger, suprathreshold lesions, accurate temperature measurement is impossible with this device. The tissue begins to coagulate during treatment, which compromises the initial pressure-to-temperature calibration. In order to estimate tissue coagulation, we formulated a particular damage function that evaluated both calibrated and uncalibrated optoacoustic transients. After empirical adjustments, this formula provided the characteristic curves used in this study.

Five different characteristic curves for different uniform lesion strengths were found. Besides a previously published TTC criterion¹⁹ (which corresponds to the TTC group 3 in this study), two lower intensities (groups 1, 2) and two higher intensities (groups 4, 5) were introduced in the present study.

Color Fundus Imaging and Retinal Lesion Diameter Assessment

We obtained fundus color photographs 2 hours after the treatment, using a Zeiss VISUCAM (Carl Zeiss Meditec AG). Three observers measured the lesion areas in these images. Edematous halos were excluded from the measurements, because they represent surrounding subretinal edema, but not retinal denaturation.^{24–26} Every lesion was outlined

manually in image editing software (GIMP Ver. 2.8., www.gimp.org), its pixel size measured in ImageJ software (www.rsweb.nih.gov/ij/) and the pixel and real circle diameters calculated. The pixel-to-micrometer scale was $9.5 \pm 0.7 \mu\text{m}/\text{pixel}$.²⁷ If only one observer recognized a particular lesion, it was classified invisible (diameter 0), otherwise the mean diameter was used as an estimate of the real spot size. Comparing the three measurements, we excluded out-of-range values as defined previously.²⁴ We chose that method in order to rule out any observer-dependency and bias in the assessment of faint and/or poorly outlined fundus lesions.

OCT Analysis

OCT images were acquired after 2 hours, 1 week, 1 and 3 months. We scanned the treated area in 30- μm steps using a spectral-domain OCT (HRA + OCT Spectralis; Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). We averaged 20 B-scans per sectional image and traced every lesion through consecutive OCT series using the AutoRescan function.

The greatest linear diameter (GLD) of a lesion was measured in the proprietary software of the OCT machine. We measured the GLD at the photoreceptor inner segment-to-outer segment junction line or, if this measurement was not unequivocal, at the RPE level. Each sectional image that showed a lesion was thoroughly reviewed, and the widest diameter passing through the lesion was measured as GLD.

In order to assess the burn intensity of each lesion, we graded lesions on 2 hour OCT images according to a seven-stage classifier that we had validated and published separately.²⁴ Characteristics of these intensity classes are reviewed in Figure 4. Lesion intensity will be referred to by the term “OCT class.”

Statistics

We used Fisher’s exact test for the analysis of the association of two categorical variables, such as TTC group and OCT class, or visibility. We calculated corresponding *P* values on the basis of Monte-Carlo simulations ($n = 10,000$ samples). The influence of a categorical variable, like TTC group, on a continuous variable, like diameter, was tested nonparametrically in a Kruskal-Wallis test. These tests were performed for the entire sample and for each of the six rabbit eyes separately. The tests were adjusted for multiple testing by the Bonferroni-method. The correlation of laser power and ophthalmoscopic lesion diameter was evaluated by simple linear

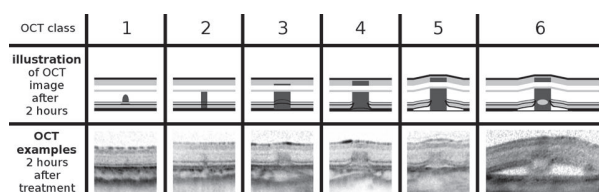


Figure 4. Summary of OCT-based lesion intensity classes that were used in this study. The *upper row* shows a schematic drawing of characteristic OCT changes for each class. The *lower row* shows an OCT example taken 2 hours after exposure. Seven lesion classes were defined as follows: Class 0: Lesion never became detectable in OCT images (not shown). Class 1: Thickening of the inner segment (IS) – outer segment (OS) junction line, and slight darkening of the outer nuclear layer (ONL). These lesions may be easily missed in OCT images. Class 2: *Dark column* throughout the OS, IS and ONL layers, wider than in a class 1 lesion. The external limiting membrane (ELM) remains flat. Class 3: Thinning of the RPE. Upward protrusion of IS–OS junction line and ELM, but preserved layer continuity. Darkening includes partial thickness of the inner plexiform layer (IPL) but is discontinuous and spares the outer plexiform layer (OPL). Class 4: RPE is detached from Bruch's membrane (BM) and protrudes upward, while the space in between remains dark. *Dark OS tips*, IS–OS junction line and ELM are interrupted and bent upward at the lesion border. OS tips and IS–OS junction lines merge at the lesion border. IPL darkening increases compared to class 3. Class 5: Perilesional neurosensory detachment, which protrudes the entire retina upward. Facultative discoloration of the ganglion layer (GL). Class 6: *Additional bright spot* in the *dark central column* at the level of the PS. Facultative full thickness darkening including OPL and inner nuclear layer (INL; Figure and description modified from Koinzer et al. 2013.²⁴ Courtesy of Wiley-Blackwell publishers).

regression. All tests performed were two sided. P values below 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were carried out with SPSS software, version 20 (IBM Corp., Armonk, NY).

Results

We applied 1022 photocoagulation lesions in six eyes of three rabbits. The irradiation diameter on the fundus was 133 μm . Power was varied from 20 to 66.4 mW, and exposure times that the automatic algorithm adjusted ranged from 7 to 1384 ms. In three lesions, automatic TTC control failed, and exposures were continued beyond the preselected maximum interval of 800 ms, up to 1384 ms. Failure was due to calibration errors or false parameter settings. These three lesions were excluded from the analysis. Four lesions were exposed less than 10 ms, but at least 7 ms, and were included in the analysis.

Of 1022 lesions, 225 were control lesions (200 ms,

power range 20–65.7 mW, and power variation 329%). Automatically controlled lesions were applied in five TTC groups, where TTC group 1 indicates the softest lesions and TTC group 5 the most intense lesions. One hundred nineteen lesions were TTC group 1 (20–50.1 mW, 251%), 141 TTC group 2 (20–58.1 mW, 291%), 223 TTC group 3 (20–65.2 mW, 326%), 190 TTC group 4 (25–56.5 mW, 226%), and 124 TTC group 5 lesions (27.5–66.4 mW, 241%). The distribution of treatment laser powers in each TTC group is shown in histogram plots in [Supplementary Figure S1](#).

A complete dataset including a 2 hour fundus color image, and 2 hour, 1 week, 1 and 3 months OCT images as well could be obtained of 486 lesions, 22 of which were covered by but undetectable in OCT images. We conducted several analyses that did not require all of these data, such as presented in [Figure 5](#), where only 2 hour images were used, which allowed us to use a greater number of lesions for evaluation. Likewise, sample sizes differ in other analyses as well ([Fig. 5–7, Table 1](#)) and are indicated in each Figure separately.

Qualitative Lesion Evaluation ([Fig. 2](#))

[Figure 2](#) shows a fundus image 2 hours after photocoagulation. The diameters of 200 ms exposure lesions vary significantly with power. TTC groups that were created with different power settings appear more homogenous than standard lesions. TTC group 2 lesions are close to the threshold of ophthalmoscopic visibility and may, or may not, be visible, while group 1 lesions are mostly invisible (right).

Correlation of Laser Power and Ophthalmoscopic Diameter

The diameter of ophthalmoscopically visible lesions correlates linearly to laser power for fixed exposure time ([Fig. 1](#), left).^{19,28} In our study, the linear R^2 value was 0.473 for standard 200 ms lesions. The corresponding R^2 values for TTC groups 1 through 5 were less than 0.001, 0.007 ([Fig. 1](#), right), 0.049, 0.066, and 0.051. Thus, TTC lesions show no (linear) correlation of fundus diameter and laser power. This confirms statistically the qualitative findings from [Figure 2](#).

Threshold Evaluation ([Fig. 5](#))

[Figure 5](#) shows the percentages of lesions that were visible in fundus color images (red) and OCT images (gray) after 2 hours in each TTC group. The influence of the TTC group was significant for both (Fisher's exact

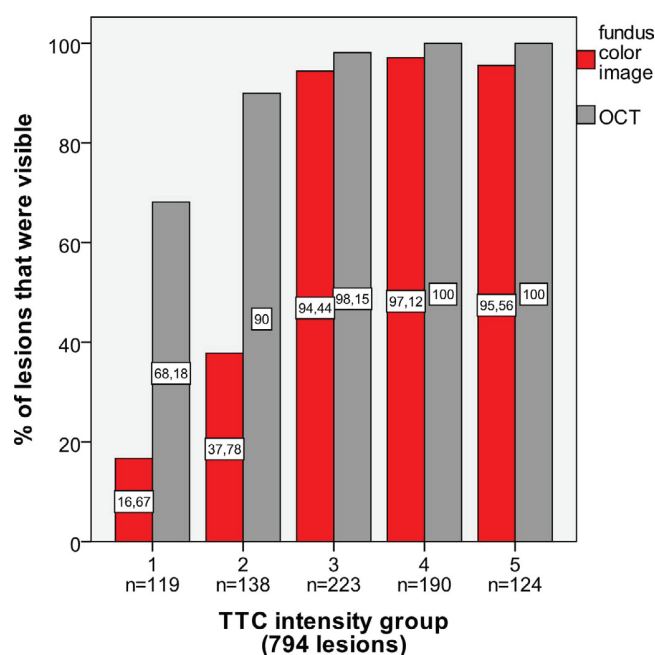


Figure 5. Percentages of lesions in each TTC group that became detectable in fundus color images (red bars) and OCT images (gray bars) after 2 hours. The impact of the TTC group on both parameters was significant ($P < 0.001$). Sample sizes for TTC groups are indicated at the x-axis. Seven hundred ninety-four lesions qualified for evaluation.

test, $P < 0.001$). In TTC group 1, only 17% of lesions became visible on the fundus image after 2 hours, but 68% could be detected in OCT images. In TTC group 2, 38% of lesions were detected on fundus images, but 90% in OCT. As visibility on the fundus increases over time after lesion application, and immediate ophthalmoscopic judgement is less sensitive than triple evaluation of highly upscaled digital images as performed in this study, TTC groups 1 and 2 were invisible during the treatment and would qualify clinically as subvisible lesions. OCT proves that the majority of TTC group 1 and 2 lesions had a biomorphological effect. For higher TTC groups 3 to 5, visibility was greater than 94% in both imaging modalities.

With regard to threshold evaluations, one has to keep in mind the proper definition of a threshold. Calculation of threshold powers or temperatures in photocoagulation is usually done by probit analyses, where the threshold indicates power or temperature values with a 50% chance to achieve a visible lesion (ED50). As the biological effect of identical stimuli varies, even if the temperature is controlled, we cannot expect to determine TTC groups that are completely invisible on the fundus, or completely detectable in OCT.

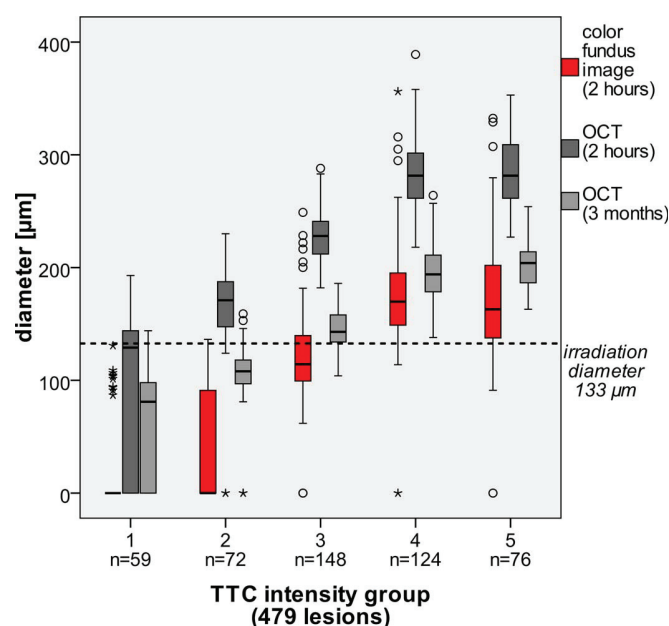


Figure 6. Box plots of the parameters ophthalmoscopic diameter after 2 hours (red), OCT GLD after 2 hours (dark gray) and OCT GLD after 3 months (light gray) for each TTC group. A dotted horizontal line indicates the irradiated diameter of 133 μm . The same data and P values are given numerically in Table 1. Sample sizes for TTC groups are indicated at the x-axis. Four hundred seventy-nine lesions qualified for evaluation.

Lesion Diameters (Fig. 6, Table 1)

Figure 6 and Table 1 show box plots and numerical data of lesion diameters in fundus images after 2 hours and in OCT images after 2 hours and 3 months. All three parameters correlate significantly with the TTC group, which applies to the global analysis and to separate analyses of each of the six rabbit eyes as well (each of 21 Kruskal-Wallis tests: $P \leq 0.001$). Automatic laser exposure control worked properly in each rabbit eye. Imaging data acquired after 1 and 4 weeks are consistent with and redundant to these findings and are therefore not shown.

Ophthalmoscopic lesion diameters were smaller than GLD values after 2 hours, but GLD's shrunk over 3 months. All three parameters, ophthalmoscopic diameter, OCT GLD after 2 hours and OCT GLD after 3 months, increased significantly with TTC groups 1 to 4, but remained constant between groups 4 and 5, as is confirmed by pairwise comparison (Table 1). TTC group 3 produces lesions equally large in fundus color images as the irradiation beam. OCT GLD's of these group 3 lesions have not been measured before.¹⁹ Groups 4 and 5 have equal diameters that are larger than the corresponding values for group 3.

Table 1. Lesion Diameters of Different TTC Groups, Shown Numerically for Ophthalmoscopic Diameters after 2 Hours and OCT GLD's after 2 Hours and 3 Months

TTC Group	n	Ophthalmoscope Diamater		GLD		GLD	
		2 h, μm	P Value [Pairwise]	2 h, μm	P Value [Pairwise]	3 mo, μm	P Value [Pairwise]
1	59	0 (0–0)		129 (0–144)		81 (0–98)	
2	72	0 (0–93)	1 vs. 2 < 0.001	171 (147–188)	1 vs. 2 < 0.001	108 (97–118)	1 vs. 2 < 0.001
3	148	114 (99–140)	2 vs. 3 < 0.001	228 (212–241)	2 vs. 3 < 0.001	143 (134–158)	2 vs. 3 < 0.001
4	124	170 (149–195)	3 vs. 4 < 0.001	282 (261–302)	3 vs. 4 < 0.001	194 (178–211)	3 vs. 4 < 0.001
5	76	163 (137–202)	4 vs. 5 1	282 (260–309)	4 vs. 5 1	204 (186–214)	4 vs. 5 1
P		< 0.001		< 0.001		< 0.001	

The same data are displayed graphically in [Figure 6](#). The table shows median and interquartile range (IQR) values. Below each column, *P* values for the indicated parameter are given, and in each line, *P* values of pairwise comparisons (Kruskal-Wallis test). Only lesions with a complete data set (2 hour color fundus images and two consecutive OCT images) were included in the evaluation. All values increase for TTC groups 1 through 4 and remain stable between groups 4 and 5.

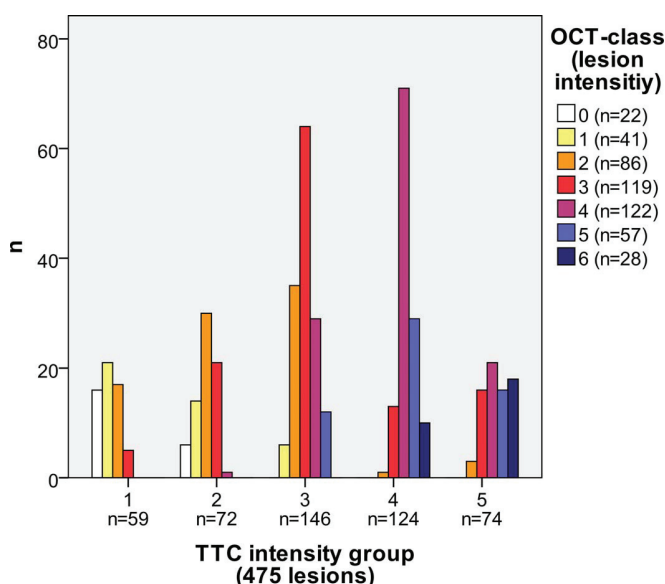


Figure 7. The distribution of OCT lesion classes for all TTC groups in absolute numbers. OCT classes reflect lesion intensity, or axial extension, respectively. The classes are displayed by different color bars as indicated in the legend, with increasing intensity from white via red to blue. Sample sizes are given for OCT classes in the legend and for TTC groups at the x-axis. Four hundred seventy-five lesions qualified for evaluation. Lesion intensity increases significantly with the TTC group ($P < 0.001$).

Lesion Intensities ([Fig. 7](#))

Control lesions achieved OCT classes 2 to 6, but never class 1 (data not shown, for class definitions see [Fig. 4](#)).

[Figure 7](#) shows how OCT classes were distributed in each TTC group. OCT classes reflect the intensity of a lesion, or the axial extent, respectively.²⁴ The correlation of TTC groups and OCT classes was statistically significant (Fisher's exact test, $P < 0.001$). TTC group 1 achieved predominantly class 1 lesions, but also a significant proportion of class 0 lesions, which were invisible in OCT images (see also [Fig. 5](#)). TTC group 2 achieved predominantly class 2 lesions and only very few class 0 lesions. The predominating OCT classes were 3 in TTC group 3, and 4 in TTC group 4. In TTC group 5, classes 3 to 6 occurred almost equally, but classes 5 and 6 occurred more often than in TTC group 4. TTC group 5 showed the most severe photocoagulation damage, but more lesion variability than other TTC groups.

Discussion

In this study, we evaluated a novel photocoagulation exposure time control, which is intended to automatically create reproducible photocoagulation

lesions independently of lesion location, individual eye and treating physician. The treatment device measures fundus temperature increments noninvasively in real-time with 1-kHz sampling rate¹⁶ and stops the treatment laser, when a predefined TTC criterion is achieved.¹⁸ Five different TTC intensities were evaluated clinically in order to define adequate TTC criteria for subvisible and ETDRS intensity treatments.

We applied 1022 photocoagulation lesions. Lesion visibility after 2 hours allowed identifying of subvisible lesions, and lesion diameters and GLD's after 2 hours and 3 months allowed to evaluate lesion homogeneity. In order to assess lesion intensity, or axial extension, respectively, we applied a recently published OCT-based grading system²⁴ that differentiates one undetectable and six detectable lesion classes in 2 hour OCT images. We consider this to be the most important measure, as axial lesion extension correlates with functional damage to the retinal nerve fibre layer, which is thought to cause extended scotoma and should therefore be avoided.

Conventional judgement of photocoagulation lesions evaluates retinal whitening in three or four categories,^{29–31} which is observer-dependent and requires evaluation by several investigators in clinical trials.³² The judgement depends on the latency from application to evaluation as well.²⁵ The lack of prospective lesion control carries the risk of significant misdoseage if fundus susceptibility to laser irradiation varies strongly from one lesion to the next. These disadvantages have already been realized more than 30 years ago,³³ but none of the earlier approaches solved the problem.^{34–36}

The therapeutic window of retinal photocoagulation is defined to be the ratio of laser power that induces retinal rupture by the power that induces retinal blanching. The therapeutic window is wide enough for treatment according to ETDRS requirements (>50 ms).³⁷ It narrows for shorter exposure times and closes at approximately 1 ms, where retinal whitening and rupture occur at similar power settings.³⁸ Nonetheless, lesion complications like choroidal bleeding remain an exception even in 20-ms exposures.^{39,40} We have previously shown that the temperature range of ETDRS 20 to 200 ms lesions is large. These lesions are created in patients at peak temperatures of approximately 95°C up to 180°C,¹⁷ the latter being the calculated threshold for retinal rupture.³⁸ For this reason, panretinal ETDRS lesions can be safely created with conventional laser power control in spite of its shortcomings, but they do show significant variability.¹⁷

Optoacoustics enable accurate temperature measurements only in native tissue conditions. In cases of significant tissue coagulation during treatment irradiation, the thermomechanical characteristics of the tissue will change. Consequently, temperature monitoring becomes less accurate, and the uniformity of the resulting automatically controlled lesions is impaired in high TTC groups. This study was partly designed to find the upper intensity limit that TTC control can safely produce, and it seems to be TTC group 5. Group 5 lesions were stronger, but less homogenous than TTC group 4 lesions. TTC group 5 lesions have gentle necrotic cores (Fig. 2) and correspond to the intensity commonly applied in panretinal ETDRS lesions, which are sought to induce “moderate” whitening. Hence, the introduced exposure time control would allow to create intensities up to ETDRS panretinal lesions, but most likely not for retinopexy at this stage. Improved temperature-based shutoff strategies may solve this problem, such as predictive exposure time calculation based on temperature data measured during the initial milliseconds of a treatment. Failure of TTC in 3 of 797 lesions had other reasons and did not occur in group 5 lesions.

TTC dosage addresses primarily softer lesions. The temperature range of subvisible lesions is less than 10°C, as the RPE viability threshold has been found to be about 53°C,^{38,41} and visible lesions in rabbits and patients are created at temperatures of little above 60°C (OCT class 2 and 3 at 200 ms).^{17,24} The temperature increments from one OCT class to the next in 200 ms lesions are in the order of 5°C for OCT classes 3 to 5 and about 10°C for classes 5 to 6 (in rabbits). The corresponding temperatures for 100 ms lesions have never been determined, but patient data imply that these values should be very similar (difference to 200 ms thresholds is estimated at 1°C to 2°C).¹⁷ It is obvious that standard laser dosage on the basis of ophthalmoscopic visibility must fail in these small temperature ranges, particularly for lesions that are not even visible on the fundus. Even in TTC lesions, there is some variability, which becomes obvious through the width of whiskers in Figure 6 and through the range of OCT classes achieved for each TTC intensity class (Fig. 7).

There are essentially three sources of lesion variability in this study. The first is variability of the biological response to identical thermal stimuli, which is inevitable. The second is inaccuracy of experimental lesion assessment. We used an elaborate diameter assessment protocol and established an OCT classifier to retrieve information on axial lesion extension, but

even these optimized methods do not have perfect objectivity and reliability. The third source of variability is inaccuracy of the laser dosage device. Our setup does not allow to determine the particular impact of either of the three contributing factors. Nevertheless, each TTC group limited the range of OCT classes sufficiently to allow reliable creation of sub- or suprathreshold lesions or to avoid damage to the retinal nerve fibre layer.

Certain technical limits of optoacoustic temperature determination, which postulates homogenous tissue pigmentation in its computational model and becomes invalid once tissue coagulation sets in, could be overcome by OCT-based temperature determination as we have shown in a previous publication.⁴² OCT-based automated photocoagulation dosage is, however, not yet available due to its technical complexity.

In our study, the TTC algorithm compensated for natural pigmentation variations of 200% to 300% on the fundus³⁸ and was still capable to level power variations of 226% to 326% within the desired exposure time frame, giving a good therapeutic window. Even outside this window, like in lesions with inadequately high power setting or unexpectedly high light transmission to a densely pigmented area of retina, severe overtreatment can be reliably prevented by exposure time reduction down to 4 ms.¹⁹ On the other hand, undertreatment would occur in lesions that fail to meet the TTC criterion within 800 ms. In a clinical setting, the software could inform the surgeon about under- or overtreatment if exposure times exceed the 10- to 800-ms range, and remind him to adjust power properly. Alternatively, a self-learning algorithm could adjust treatment power automatically. This would represent a significant progress compared with the clinical state-of-the-art.

Over the past 10 years, various studies have applied lesions softer than ETDRS intensity clinically, and many of those pilot-type studies showed promising results.^{8,10–13,43,44} In those studies, lesion intensities were controlled by a variety of inconsistent criteria, which produced different outcomes, makes lesion characteristics incompatible and prevents meta-analyses. Automatic laser exposure control as presented in this study is, to the authors' knowledge, the only functional way to accurately create well-defined lesion intensities above and below the visibility threshold. Possible intensities include subvisible lesions, which we defined to be visible in OCT but invisible on the fundus during the treatment (TTC groups 1–2), very soft lesions as would be appropriate for (modified) ETDRS macular treatment (TTC groups 3–4) or for ETDRS

panretinal treatment (TTC groups 4–5). Thermally stimulating lesions that remain undetectable even in OCT could most likely be created as well by appropriate adaptation of the TTC curve.

Conclusions

The presented technique facilitates automatic standardized fundus lesions that are independent of treating physician, individual eye, and treatment location. The method would, for the first time, allow objective dosage of laser photocoagulation lesions. This is a prerequisite for controlled clinical trials that investigate the minimal clinically effective lesion intensity of retinal photocoagulation. The transfer of optoacoustic real-time fundus temperature detection to patients has already been successful,¹⁷ and automatic exposure control shall be at hand for clinical pilot studies shortly. In a patient application, the accuracy of lesion reproducibility should be clinically confirmed, and TTC criteria might need some adaptation from rabbit to human conditions, but those issues appear fairly easy to handle.

Acknowledgments

Supported by grants from the German Ministry of Education and Research (BMBF) according to the Innovation Award for Advancing Medical Technology 2006, grant #01EZ0734 (Department of Ophthalmology, University hospital of Schleswig-Holstein, Campus Kiel), #01EZ0732 (Medical Laser Centre Lübeck), #01EZ0733 (Institute of Biomedical Optics Lübeck), and #01EZ0735 (Carl Zeiss Meditec AG).

The research presented here has been subject of a poster presentation at the 2013 ARVO annual meeting (program no. 4131).

Disclosure: **S. Koinzer**, None; **A. Baade**, None; **K. Schlott**, None; **C. Hesse**, None; **A. Caliebe**, None; **J. Roeder**, None; **R. Brinkmann**, Patent rights

A German translation of the abstract is available in the supplemental material.

References

1. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. Preliminary report on effects of photo-

- coagulation therapy. *Am J Ophthalmol.* 1976;81:383–396.
2. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy: the second report of diabetic retinopathy study findings. *Ophthalmology* 1978;85:82–106.
3. Shah AM, Bressler NM, Jampol LM. Does laser still have a role in the management of retinal vascular and neovascular diseases? *Am J Ophthalmol.* 2011;152:332–339.e1.
4. Fong DS, Girach A, Boney A. Visual side effects of successful scatter laser photocoagulation surgery for proliferative diabetic retinopathy: a literature review. *Retina* 2007;27:816–824.
5. Brinkmann R, Roider J, Birngruber R. Selective retina therapy (SRT): a review on methods, techniques, preclinical and first clinical results. *Bull Soc Belge Ophthalmol.* 2006;302:51–69.
6. Roider J, Lindemann C, el-Hifnawi S, Laqua H, Birngruber R. Therapeutic range of repetitive nanosecond laser exposures in selective RPE photocoagulation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1998;236:213–219.
7. Pelosini L, Hamilton R, Mohamed M, Hamilton AP, Marshall J. Retina rejuvenation therapy for diabetic macular edema: a pilot study. *Retina* 2013;33:548–558.
8. Luttrull JK, Musch DC, Spink CA. Subthreshold diode micropulse panretinal photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy. *Eye* 2008;22:607–612.
9. Lavinsky D, Sramek C, Wang J, et al. Subvisible retinal laser therapy: titration algorithm and tissue response. *Retina* 2014;34:87–97.
10. Koinzer S, Elsner H, Klatt C, et al. Selective retina therapy (SRT) of chronic subfoveal fluid after surgery of rhegmatogenous retinal detachment: three case reports. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008;246:1373–1378.
11. Roider J, Liew SHM, Klatt C, et al. Selective retina therapy (SRT) for clinically significant diabetic macular edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2010;248:1263–1272.
12. Klatt C, Saeger M, Oppermann T, et al. Selective retina therapy for acute central serous chorioretinopathy. *Br J Ophthalmol.* 2011;95:83–88.
13. Lavinsky D, Cardillo JA, Melo LAS Jr, Dare A, Farah ME, Belfort R Jr. Randomized clinical trial evaluating mETDRS versus normal or high-density micropulse photocoagulation for diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:4314–4323.
14. Luttrull JK, Sramek C, Palanker D, Spink CJ, Musch DC. Long-term safety, high-resolution imaging, and tissue temperature modeling of subvisible diode micropulse photocoagulation for retinovascular macular edema. *Retina* 2012;32:375–386.
15. Kandulla J, Elsner H, Birngruber R, Brinkmann R. Noninvasive optoacoustic online retinal temperature determination during continuous-wave laser irradiation. *J Biomed Opt.* 2006;11:041111.
16. Brinkmann R, Koinzer S, Schlott K, et al. Real-time temperature determination during retinal photocoagulation on patients. *J Biomed Opt.* 2012;17:061219.
17. Koinzer S, Schlott K, Portz L, et al. Correlation of temperature rise and optical coherence tomography characteristics in patient retinal photocoagulation. *J Biophotonics* 2012;5:889–902.
18. Schlott K, Koinzer S, Ptaszynski L, et al. Automatic temperature controlled retinal photocoagulation. *J Biomed Opt.* 2012;17:061223.
19. Koinzer S, Schlott K, Ptaszynski L, et al. Temperature controlled retinal photocoagulation—a step toward automated laser treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:3605–3614.
20. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group. Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. *Arch Ophthalmol.* 1985;103:1796–1806.
21. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. *Ophthalmology.* 1991;98:766–785.
22. Baade, A, Schlott K, Luft S, et al. Accuracy of real-time optoacoustic temperature determination during retinal photocoagulation. *Proc SPIE.* 2011;8092:80921B.
23. Birngruber R, Hillenkamp F, Gabel VP. Theoretical investigations of laser thermal retinal injury. *Health Phys.* 1985;48:781–796.
24. Koinzer S, Hesse C, Caliebe A, et al. Photocoagulation in rabbits: optical coherence tomographic lesion classification, wound healing reaction, and retinal temperatures. *Lasers Surg Med.* 2013;45:427–436.
25. Weinberg W, Gabel V-P, Birngruber R, Lorenz B, Müller W. Time Sequence of the White Hue Correlated with the Extent of Damage in Photocoagulation of the Retina [article in German]. *Ber Dtsch Ophthalmol Ges.* 1981;78:603–606.
26. Koinzer S, Saeger M, Hesse C, et al. Correlation with OCT and histology of photocoagulation

- lesions in patients and rabbits. *Acta Ophthalmol.* 2013;91:e603–e611.
27. Koinzer S, Bajorat S, Hesse C, et al. Calibration of histological retina specimens after fixation in Margo's solution and paraffin embedding to in-vivo dimensions, using photography and optical coherence tomography. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014;252:145–153.
28. Jain A, Blumenkranz MS, Paulus Y, et al. Effect of pulse duration on size and character of the lesion in retinal photocoagulation. *Arch Ophthalmol.* 2008;126:78–85.
29. Tso MO, Wallow IH, Elgin S. Experimental photocoagulation of the human retina. I. Correlation of physical, clinical, and pathologic data. *Arch Ophthalmol.* 1977;95:1035–1040.
30. Muqit MMK, Marcellino GR, Henson DB, Fenerty CH, Stanga PE. Randomized clinical trial to evaluate the effects of pascal panretinal photocoagulation on macular nerve fibre layer: Manchester Pascal Study Report 3. *Retina.* 2011;31:1699–1707.
31. Palanker D, Lavinsky D, Blumenkranz MS, Marcellino G. The impact of pulse duration and burn grade on size of retinal photocoagulation lesion: implications for pattern density. *Retina* 2011;31:1664–1669.
32. Kang H, Su L, Zhang H, Li X, Zhang L, Tian F. Early histological alteration of the retina following photocoagulation treatment in diabetic retinopathy as measured by spectral domain optical coherence tomography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2010;248:1705–1711.
33. Birngruber R, Gabel VP, Hillenkamp F. Fundus reflectometry: a step towards optimization of the retina photocoagulation. *Mod Probl Ophthalmol.* 1977;18:383–390.
34. Inderfurth J, Ferguson R, Frish M, Birngruber R. Dynamic Reflectometer for Control of Laser Photocoagulation on the Retina. *Lasers Surg Med.* 1994;15:54–61.
35. Jerath MR, Chundru R, Barrett SF, Rylander HG III, Welch AJ. Reflectance feedback control of photocoagulation in vivo. *Arch Ophthalmol.* 1993;111:531–534.
36. Pomerantzeff O, Wang GJ, Pankratov M, Schneider J. A method to predetermine the correct photocoagulation dosage. *Arch Ophthalmol.* 1983;101:949–953.
37. Mainster MA. Decreasing retinal photocoagulation damage: principles and techniques. *Semin Ophthalmol.* 1999;14:200–209.
38. Sramek C, Paulus Y, Nomoto H, Huie P, Brown J, Palanker D. Dynamics of retinal photocoagulation and rupture. *J Biomed Opt.* 2009;14:034007.
39. Velez-Montoya R, Guerrero-Naranjo JL, Gonzalez-Mijares CC, et al. Pattern scan laser photocoagulation: safety and complications, experience after 1301 consecutive cases. *Br J Ophthalmol.* 2010;94:720–724.
40. Muqit MMK, Marcellino GR, Henson DB, et al. Single-session vs multiple-session pattern scanning laser panretinal photocoagulation in proliferative diabetic retinopathy: the Manchester Pascal Study. *Arch Ophthalmol.* 2010;128:525–533.
41. Denton ML, Noojin GD, Foltz MS, et al. Spatially correlated microthermography maps threshold temperature in laser-induced damage. *J Biomed Opt.* 2011;16:036003.
42. Mueller HH, Ptaszynski L, Schlott K, et al. Imaging thermal expansion and retinal tissue changes during photocoagulation by high speed OCT. *Biomed Opt Express* 2012;3:1025–46.
43. Figueira J, Khan J, Nunes S, et al. Prospective randomised controlled trial comparing sub-threshold micropulse diode laser photocoagulation and conventional green laser for clinically significant diabetic macular oedema. *Br J Ophthalmol.* 2009;93:1341–1344.
44. Bandello F, Brancato R, Menchini U, et al. Light panretinal photocoagulation (LPRP) versus classic panretinal photocoagulation (CPRP) in proliferative diabetic retinopathy. *Semin Ophthalmol.* 2001;16:12–18.

Classification of rabbit photoocoagulation lesions in OCT and class-related coagulation temperatures

C Hesse¹, S Koinzer¹, A Baade², K Schlott³, A Caliebe⁴, M Saeger¹, R Brinkmann², J Roeder¹

¹Department of Ophthalmology and ⁴Institute of Medical Informatics and Statistics, Christian-Albrechts-University of Kiel
²Medical Laser Center Lübeck GmbH ³Institute of Biomedical Optics, University of Lübeck, 1-4 Germany



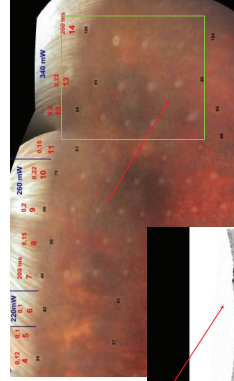
Financial disclosure:
Brinkmann Pat. rights

Introduction

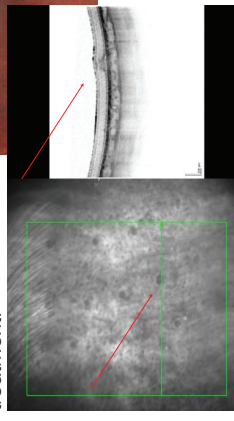
This study defines OCT-morphological classes of retinal photoocoagulation lesions in rabbits, class-matched retinal temperatures and lesion development over 3 months.

Study design

Right: Fundus color image of a rabbit fundus two hours after the treatment.

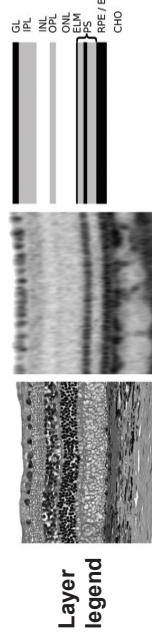


Left: Corresponding OCT raw image. A red arrow pinpoints one exemplary photoocoagulation lesion.



Methods

1022 photoocoagulation lesions (133 µm diameter) were applied to 6 eyes of 3 rabbits at variable laser power and exposure time. Our modified 532 nm photoocoagulator allowed temperatures at measurements based on optoacoustics. Peak temperatures at the end of irradiation in the lesion center at the retinal pigment epithelium level were evaluated for every lesion. 2 hours, 1, 4 and 12 weeks after treatment, we examined fundus color and Spectralis® OCT images. We determined OCT-morphological lesion characteristics and ophthalmoscopic diameters after two hours, and greatest linear OCT-diameters (GLD) at all timepoints.



Aligned retinal images from histology (left), OCT (middle) and a schematic drawing (right). **GL:** ganglion cell layer, **IPL:** inner plexiform layer, **INL:** inner nuclear layer, **OPL:** outer plexiform layer, **ONL:** outer nuclear layer, **ELM:** external limiting membrane, **PS:** photoreceptor segments, **RPE/BM:** retinal pigment epithelium/Bruch's membrane, **CHO:** choroid.

Results

The image shows lesion class definitions and OCT examples, clinical characteristics and wound healing, and temperature data.

Following OCT morphological lesion classes were defined:

OCT class	1	2	3	4	5	6
Illustration of OCT image after 2 hours						
OCT examples 2 hours after treatment						
1 week after treatment						
1 month after treatment						
3 months after treatment						
power duration temperature diameter	43 mW 23 ms 56 °C 0	43 mW 57 ms 56 °C 0	83 mW 200 ms 64 °C 167 µm	40 mW 200 ms 66 °C 186 µm	53 mW 200 ms 68 °C 204 µm	58 mW 200 ms 96 °C 238 µm
GLD 2 hours	124 µm	136 µm	234 µm	320 µm	397 µm	554 µm
1 week	100 µm	127 µm	229 µm	303 µm	376 µm	394 µm
1 month	82 µm	118 µm	213 µm	269 µm	297 µm	320 µm
3 months	65 µm	96 µm	175 µm	218 µm	247 µm	279 µm

Class 0: Lesion never detectable in OCT images (not shown).

Class 1: Thickening of the IS-OS junction, slight darkening of the ONL.

Class 2: Dark column throughout the PS-OS, PS-IS and ONL layers, wider than in a class 1 lesion. The ELM remains flat.

Class 3: Thinning of the RPE. Upward protrusion of IS-OS junction and ELM, preserved layer continuity. Partial darkening of IPL which spares the OPL and the INL.

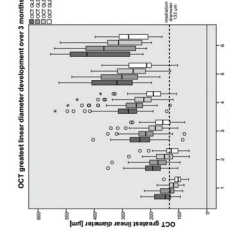
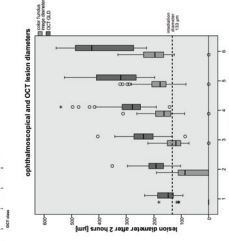
Class 4: RPE detached from BM, dark space in between RPE and BM. Dark PS-OS tips. Interrupted IS-OS junction line and ELM with protrusion at the lesion border, where PS-OS tips and IS-OS junction lines merge. Increasing IPL darkening.

Class 5: Perilesional neurosensory detachment which protrudes the entire retina upward. Facultative discoloration of the GL.

Class 6: Additional bright spot in the dark central column at the level of the PS. Facultative full thickness darkening including OPL and INL.

Class-related clinical characteristics and wound healing

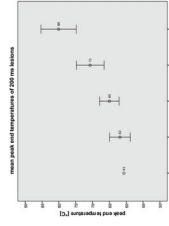
Top: Percentage of lesions that were ophthalmoscopically visible after two hours; classes 1 and 2 were invisible during the treatment.



Left: Ophthalmoscopic diameters (light grey) and OCT GLD's (dark grey) of each class after two hours. GLD's were larger than ophthalmoscopic lesion diameters, both increased for increasing classes.

Right: GLD-development over three months for each class.

Class-related temperature data of 200 ms lesions



Left: Temperatures of class 1, 2, 5 and 6 lesions. A function of the expected temperature course according to the heat diffusion theory (thick lines) was fitted to the raw data (thin lines) to compensate for noise and artifacts.

Right: End temperatures of 200 ms lesions (mean ± 95 % CI).

Conclusions

The validity of our morphological OCT classes is supported by increasing ophthalmoscopic visibility, diameters and GLD's. OCT end-points allow standardization of photoocoagulation lesion intensity in rabbits. An OCT class analysis allows lesion temperature estimation. Classes 1 and 2 are ophthalmoscopical "sub-threshold" lesions, which are of particular interest and may be reliably detected in OCT. Our poster no. 4131, A0049 shows how these lesions can be automatically created.

Classification of rabbit photocoagulation lesions in optical coherence tomography and class-related coagulation temperatures

C. Hesse, S. Koinzer, A. Baade(MLL), K. Schlott (BMO,MLL), A. Caliebe, M. Saeger, R. Brinkmann (MLL, BMO), J. Roeder.

Purpose: The rabbit is the most common animal model for photocoagulation, particularly in histological studies. Rabbit optical coherence tomographic (OCT) findings differ from those in humans. This study presents six OCT-morphological endpoints of retinal photocoagulation lesions in rabbits and matched temperatures.

Material and Methods: We applied 1022 photocoagulation lesions of 133 μm diameter to six eyes of three rabbits and varied laser powers and exposure times. At the times of 1 hour, 1, 4 and 12 weeks after treatment, we examined fundus color images, Spectralis® OCT and infrared and autofluorescence images. We grouped the lesions according to OCT morphological criteria, measured funduscopy lesion diameters after one hour and greatest linear diameters (GLD) with OCT at all times. Our modified 532 nm photocoagulator facilitated temperature measurements based on optoacoustics. Peak temperatures at the end of irradiation in the lesion center at the retinal pigment epithelium level were evaluated for every lesion.

Results: We detected six OCT-morphological lesion classes that ranged from minimal reflectivity increases at the outer nuclear layer level (class 1) to full thickness signal increases with neurosensory detachment and an optically empty space in the center (class 6). Ophthalmoscopic visibility was 17% (class 1) to > 95% (class 4-6). Median diameters ranged from 0 (invisible, classes 1 and 2) to 200 μm (class 6). GLD's were 150 (class 1) μm to 400 μm (class 6) after 1 hour, which shrunk to 100 - 280 μm after 12 weeks, respectively. All 3 parameters increased significantly with the OCT class. For lesions with 200 ms exposure time, the peak temperatures were 60 to 80° C for class 2 to 6 lesions.

Conclusions: The validity of the OCT classes is supported by increasing ophthalmoscopic visibility, diameters and GLD's. These OCT endpoints allow standardized evaluation of photocoagulation lesion in rabbits and are applicable in repeated examinations, in contrast to histology. Moreover, it allows to estimate lesion end peak temperatures according to the presented values. Classes 1 and 2 allow recognition and differentiation of "sub-threshold" lesions, which are of particular interest. Complete retinal restoration was not observed in our study.

Characters including heading and authors: 2527 (limit: 2500)

Automatic temperature controlled retinal photocoagulation facilitates predictable lesion strengths including sub-threshold lesions



S Koinzer¹, C Hesse¹, A Baade², K Schlott³, A Caliebe⁴, M Saeger¹, R Brinkmann², J Roeder¹

¹Department of Ophthalmology and ⁴Institute of Medical Informatics and Statistics, Christian-Albrechts-University of Kiel
²Medical Laser Center Lübeck GmbH ³Institute of Biomedical Optics, University of Lübeck, ¹⁻⁴ Germany

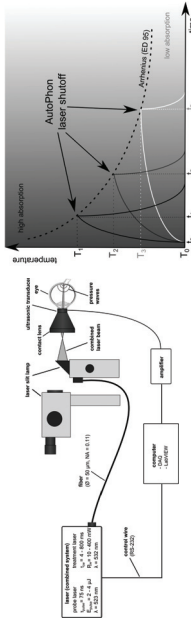
Introduction

Photocoagulation relies on retinal whitening for power adjustment. It produces inconstant lesions and does not allow to control very mild or sub-threshold lesions. We applied automatic, temperature controlled retinal photocoagulation, that uses temperature data to adjust irradiation times.

Methods

We used a modified 532nm photocoagulator that facilitated real-time retinal temperature measurements based on optoacoustics. A feedback loop allowed automatic exposure time control onto predefined time / temperature dependent characteristics for different lesion strengths. We applied lesions of 133 µm diameter to six rabbit eyes and varied laser powers (20 - 66 mW). 225 control lesions were applied conventionally with fixed, 200 ms, exposure time, and 794 lesions with the new, automatic method in five consecutive intensity groups. After 1 hour to 12 weeks, we examined fundus color and Spectralis® optical coherence tomographic (OCT) images and classified lesion morphologies according to a sixfold OCT classifier (as displayed in detail on our poster 4138, A0056).

Experimental setup and control algorithm

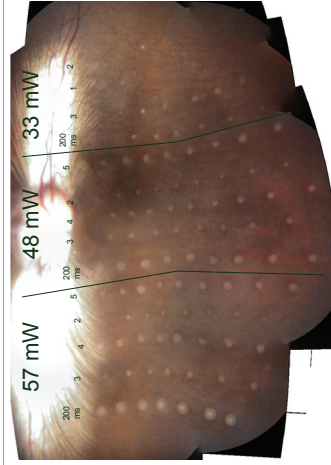


Left: A second, pulsed laser is coupled into the same fibre than the CW treatment laser. It causes short innocuous retinal tissue expansions. These induce temperature-dependent optoacoustic pressure waves which can be detected on the ocular surface by a transducer in the Mainster contact lens. The signal is amplified, converted to temperatures by a PC routine and used to control the laser exposure time.

Right: One exemplary time / temperature characteristic curve, which has been derived from an Arrhenius function and empirically adapted for homogenous lesions ("ED 95"). Any temperature profile that touches the curve will cause a lesion of constant intensity. Vertical transposition of the curve will modify lesion intensities.

Results

Control (200 ms) lesion effects depended on the laser power and achieved morphological classes 2 – 6 (statistical data not shown).

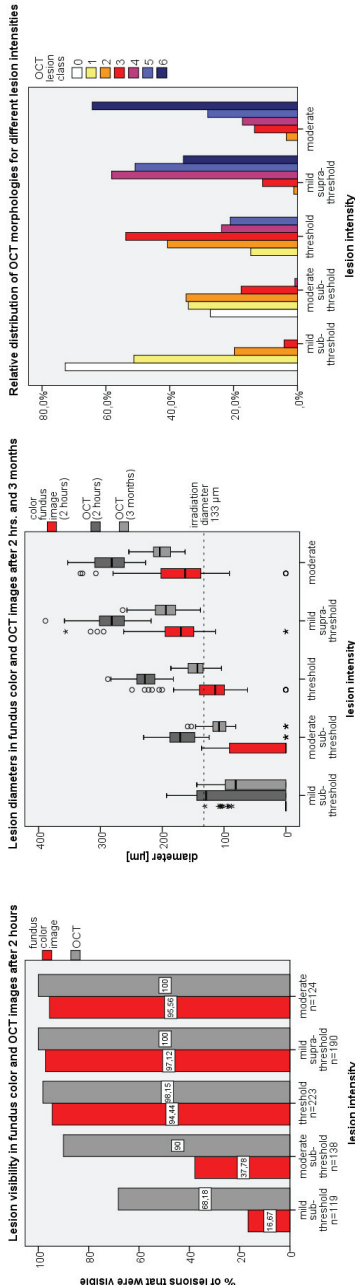


Ophthalmoscopic results

We defined 5 different automatically controlled photocoagulation endpoints or time / temperature characteristic curves, respectively, that we labelled 1 (mild subthreshold), 2 (moderate subthreshold), 3 (threshold), 4 (mild suprathreshold) and 5 (moderate). The representative fundus color panorama image shows columns of lesions that were applied with identical parameters. In this experiment, 3 different laser powers were used. 200 ms lesions served as controls, and the columns labelled 1, 2, 3, 4 and 5 show automatically controlled lesions. Since the time control is limited to a time window of 10 – 800 ms, not all characteristic curves were applicable with each power setting.

Control lesions show substantially different intensities for the different powers. Automatically controlled lesion groups, such as no. 3 (threshold), remain fairly constant in spite of significant laser power variation. The majority of group 1 (mild sub-threshold) lesions is invisible.

Statistical results



In the "mild sub-threshold" and "moderate subthreshold" groups, ophthalmoscopic visibility after 2 hours is 17% and 38%, respectively (median lesion diameters = 0 µm). These lesions are invisible during treatment and fulfill the clinical criterion of sub-threshold photocoagulation (left). They are reliably detectable in OCT, which proves their lasting biological effect. "Threshold" and stronger lesions are visible in ophthalmoscopy as well (895%) and show increasing lesion diameters for threshold and mild suprathreshold lesions (middle). From "mild suprathreshold" to "moderate" lesions, lesion intensities increase as determined by OCT morphologies (right). Generally, OCT greatest linear diameters (GLD) are larger than ophthalmoscopic diameters. They shrink from 2 hours to 3 months (middle). OCT morphology analysis reveals increasing incidence peaks for increasing intended intensity (right).

Conclusions

Automatic, temperature controlled photocoagulation allows to apply predictable lesions. Accurate and reproducible mild or subthreshold lesions can be obtained, which is not possible with conventional power control. The method prevents overtreatment as well. Automatic exposure control facilitates standardized low and medium intensity photocoagulation independently of the treating physician and of spot-individual transmission and pigmentation variation.

Automatic temperature controlled retinal photocoagulation facilitates four predictable lesion strengths including sub-threshold lesions

S. Koinzer, C. Hesse, A. Baade(MLL), K. Schlott (BMO, MLL), A. Caliebe, M. Saeger, R. Brinkmann (MLL, BMO), J. Roeder.

Purpose: Conventional photocoagulation relies on retinal whitening for power adjustment. The method produces inconstant lesions and does not allow to control the effect of very mild or sub-threshold lesions. We applied automatic, temperature controlled retinal photocoagulation, that uses temperature data to adjust irradiation times, and aimed at lesions of five different strengths in rabbits.

Material and Methods: We used a modified 532nm photocoagulator that facilitated real-time retinal temperature measurements based on optoacoustics. A feedback loop allowed automatic exposure time control onto predefined time / temperature dependent characteristics for different lesion strengths. We applied lesions of 133 μm diameter to six rabbit eyes and varied laser powers (20 - 66 mW) and intensities. N = 225 control lesions were applied conventionally with fixed, 200 ms, exposure time, and n = 794 lesions with the new, automatic method in five consecutive characteristic groups. After 1 hour to 12 weeks, we examined fundus color and Spectralis® optical coherence tomographic (OCT) images and classified lesion morphologies according to a sixfold OCT classifier.

Results: Control lesion effects depended on the laser power and achieved morphological classes 2 - 6. Automatically controlled characteristic groups 1 – 4 correlated to increasing morphological lesion intensities (incidence peaks in OCT classes 1 to 4). These groups showed increasing median funduscopy diameters (0 [IQR 0-0] μm – 170 [149-195] μm) and OCT diameters (129 [0-144] μm – 282 [261-302] μm). Group 5 did not differ significantly from group 4. Visibility rates in funduscopy (OCT) were 17 % (68 %) for group 1, 38 % (90 %) for group 2 and > 94 % (> 98%) for all consecutive groups.

Conclusions: Automatic, temperature controlled photocoagulation allows to apply predictable lesions. A reliable reproducibility for mild and subthreshold lesions can be obtained for characteristic groups 1 – 4, which is not possible with conventional power control. Only strong lesions (characteristic group 5) do not reproduce as accurately owing to technical reasons. Overtreatment, however, can be avoided in any case. The automatic control facilitates standardized low intensity photocoagulation independently of the treating physician and of spot-individual transmission and pigmentation variation.

Characters including heading and authors: 2506 (limit: 2500)

Photokoagulation – Eine überholte Therapie?

Die Therapieempfehlungen zur Photokoagulation der Retina leiten sich noch immer aus den ETDRS-Studien ab, werden jedoch in der klinischen Praxis weitgehend modifiziert, so dass aktuell in der klinischen Praxis kein einheitliches Behandlungsschema angewendet wird. Allerdings haben Studien mit modifizierten zentralen Laserbehandlungsprotokollen gezeigt, dass allein eine gute Standardisierung des Verfahrens und eine Anpassung des Protokolls beispielsweise durch erhöhte Dichte sanfterer Läsionen das klinische Outcome des Lasers deutlich optimieren kann. An der Universitäts-Augenklinik Kiel wurden Photokoagulationsläsionen sowohl im unter-schwelligen als auch im üblichen therapeutischen Bereich hinsichtlich ihrer Schadensintensität untersucht. Dr. Stefan Koinzer, Carola Hesse, Dipl. Phys. Alexander Baade, Dr. rer. nat. Ralf Brinkmann und Prof. Dr. Johann Roider (Kiel) erläutern die Forschungsergebnisse.

Die klinische Praxis der retinalen Laserphotokoagulation scheint in die Jahre gekommen zu sein. Durch seine Schmerzhaftigkeit ist das Verfahren bei Patienten und Ärzten gleichermaßen wenig beliebt. Die mit Gewebeerstörung verbundene Laserwirkung und die langfristigen Nebenwirkungen, etwa eine Verschlechterung von Dämmerungs-, Kontrast- und Farbsehen sowie Gesichtsfeldeinschränkungen (Fong et al. 2007), lassen die Photokoagulation deutlich gegen scheinbar nebenwirkungsärmere Pharmakotherapien abfallen. Aber ist die Photokoagulation wirklich so schlecht wie ihr Ruf?

Die Therapieempfehlungen der Photokoagulation leiten sich noch immer aus den großen kontrollierten ETDRS-Publikationen der 1980er und 1990er Jahre ab (Early Treatment of Diabetic Retinopa-

thy Study report number 9, 1991; ETDRS report number 1, 1985). Die Behandlungsprotokolle wurden und werden in der klinischen Praxis weitgehend modifiziert, so dass wir heute recht uneinheitliche Behandlungsregime finden (Lavinsky et al. 2011). Sie schließen etwa für die panretinale Photokoagulation die Verwendung von Rasterlasern ein, die räumlich geringer ausgedehnte und daher nebenwirkungsärmere Läsionen durch verkürzte Bestrahlungszeiten erreichen (Muqit et al. 2011). Unter den Behandlungswellenlängen wird neben dem sehr geeigneten Grünspektrum (514 oder 532 nm) zunehmend Infrarotlicht eingesetzt, das eine größere Eindringtiefe besitzt und die thermische Verbrennung in Richtung der Aderhaut verschiebt (Framme et al. 2008). Gepulste Laser wie der nanogepulste Grünlaser für die selektive Retinatherapie (Roider et al.

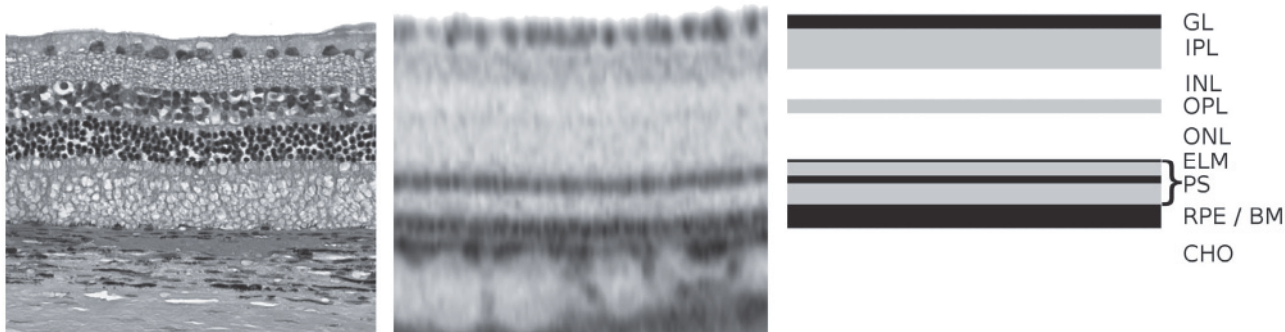

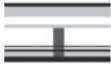




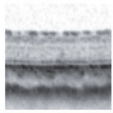
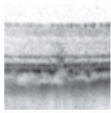
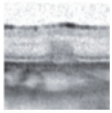
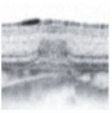
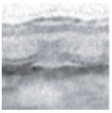
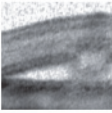
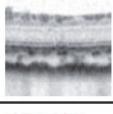
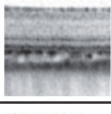
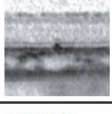
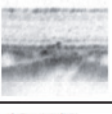
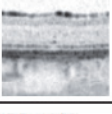
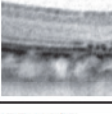


Abb. 1: Schnitte durch die Netzhaut histologisch (links), im SD-OCT (Mitte) und als Schemazeichnung (rechts). Folgende Schichten sind abgrenzbar: Ganglienzellschicht (GL), innere plexiforme Schicht (IPL), innere Körnerschicht (INL), äußere plexiforme Schicht (OPL), äußere Körnerschicht (ONL), Membrana limitans externa (ELM), Photorezeptoraußensegmente (PS) – bestehend aus einer Schicht der inneren, mitochondrienreichen Segmente (IS), einer Schicht der äußeren, membran-scheibchenhaltigen Segmente (OS) und einer dunkleren Grenzlinie zwischen beiden, der IS-OS-Junktionslinie – Fotorezeptoraußensegmentspitzen, retinalem Pigmentepithel und Bruch'scher Membran (RPE/BM), Aderhaut (CHO). (Abb. mit freundlicher Genehmigung von Wiley-Blackwell, nach Koinzer et al. 2013*)

OCT-Klasse	1	2	3	4	5	6
Schema typischer OCT-Befund						
OCT-Beispiele nach 2 Std.						
nach 3 Mo.						
Leistung	43 mW	43 mW	83 mW	40 mW	53 mW	58 mW
Dauer	23 ms	57 ms	200 ms	200 ms	200 ms	200 ms
Temperatur	56 °C	56 °C	64 °C	66 °C	68 °C	96 °C
Durchmesser	0 µm	0 µm	167 µm	186 µm	204 µm	238 µm

Klasse 0: Keine Veränderung durch den Laser im OCT erkennbar (nicht gezeigt). **Klasse 1:** Verdickung der IS-OS-Junktionslinie, diskrete Reflektivitätsabnahme der ONL. Diese sehr sanften Läsionen können im OCT leicht übersehen werden. Diese Läsionen wurden nur mit Bestrahlungszeiten deutlich unterhalb 200 ms erreicht. **Klasse 2:** Abgedunkelte Säule durch OS, IS und ONL, breitere Abdunkelung als in Klasse 1. Die ELM bleibt flach. **Klasse 3:** Ausdünnung der kräftigen dunklen RPE/BM-Linie. Vorwölbung der IS-OS-Junktionslinie und ELM unter Erhalt der Schichtenkontinuität. Die Abdunkelung erfasst einen Teil der IPL, ist aber in vertikaler Richtung diskontinuierlich und spart OPL und INL aus. **Klasse 4:** Vorwölbung des RPE von der BM nach oben, dunkler Zwischenraum. Unterbrechung der Linien von OS, IS und ELM mit nach oben gebogenen Abrisskanten. OS und IS-OS-Junktionslinie treffen am Läsionsrand aufeinander. Vermehrte Abdunkelung der IPL im Vergleich zu Klasse 3. **Klasse 5:** Periläsionale neurosensorische Netzhautabhebung, die die ganze Netzhaut nach oben vorwölbt. Fakultative Verfärbung der GL. **Klasse 6:** Zusätzlicher heller Fleck in der Mitte der dunklen Säule auf Höhe der Photorezeptoren. Fakultativ durchgehende Abdunkelung der Netzhaut einschließlich OPL und INL. (Abb. mit freundlicher Genehmigung von Wiley-Blackwell, nach Koinzer et al. 2013*)

Abb. 2: Charakteristika und Beispiele der OCT-Läsionsklassen.

1992) oder mikropulste Infrarotlaser können räumlich begrenzte Gewebeschäden hervorrufen. Alle diese Verfahren verändern die Ausdehnung und die Wirkung des einzelnen Laserherdes, während die Behandlungsempfehlungen bezüglich der Läsionsdichte und -anzahl nicht daran angepasst wurden.

Innovationen in der klinischen Photokoagulation

Es verwundert daher nicht, dass in den großen Vergleichsstudien zwischen Laserphotokoagulation und intravitrealer Anti-VEGF-Therapie die Ergebnisse der schlecht standardisierten und dem Protokoll nach veralteten zentralen Laserkoagulation einige ETDRS-Buchstaben schlechter ausfallen als die Pharmakotherapie (Schmidt-Erfurth et al. 2014). Klinische Studien mit modifizierten zentralen Laserbehandlungsprotokollen haben gezeigt, dass allein eine gute Standardisierung des Verfahrens die klinischen Ergebnisse optimiert (Kozak et al. 2011) und dass eine Anpassung des Protokolls beispielsweise durch erhöhte Dichte sanfterer Läsionen das klinische Outcome des Lasers deutlich verbessern kann (Lavinsky et al. 2011).

Es stellt sich also die Frage, wie eigentlich die Läsionsintensität mit ihrer Wirksamkeit verknüpft ist. Es ist bekannt, dass die Wirksamkeit der panretinalen Laserphotokoagulation mit der insgesamt zerstörten Netzhautfläche korreliert. Daher wurden Algorithmen vorgeschlagen, wie die Gesamtherdzahl berechnet werden könnte, wenn die Intensität des Einzelherdes reduziert wird (Koinzer et al. 2014a, Palanker et al. 2011). Alle diese Überlegungen krankten aber daran, dass es keine verlässlichen und objektivierbaren Kriterien zur Beschreibung der Herdintensität gibt. Die Unterteilung in drei bis vier Klassen der Weißfärbung ist untersucherabhängig, die Vermes-

sung des Läsionsdurchmessers am Fundusbild ist abhängig von der Latenz zwischen Herdapplikation und Evaluation, und Schwellkriterien wie die Sichtbarkeit im Angiographie- oder Fundusbild erlauben nur die Unterscheidung von je zwei Intensitätsstufen sehr sanfter Läsionen. Weiterhin bleiben sie bei unterschwelligem Läsionen den Nachweis schuldig, dass überhaupt eine Veränderung induziert wurde.

Klassifizierung von Photokoagulationsläsionen

Aus diesem Grunde bemüht sich unsere Arbeitsgruppe darum, Photokoagulationsläsionen sowohl im unterschwelligem als auch im üblichen therapeutischen Bereich hinsichtlich ihrer Schadensintensität objektiv zu beschreiben. Die hochauflösende optische Kohärenztomographie (SD-OCT) ist hierfür besonders geeignet, weil sie mit einer axialen Auflösung von idealerweise unter 5 µm eine Unterscheidung der retinalen Schichten nichtinvasiv erlaubt (Abb. 1). In unseren Arbeiten haben wir hunderte von Läsionen unterschiedlicher Intensität sowohl im Tierversuch, hier histologisch und im OCT, als auch am Patienten, dort nur im OCT, analysiert. Die Veränderungen, die bei gleichartigen Laserläsionen in Histologie und OCT erkennbar werden, unterscheiden sich sowohl qualitativ als auch in ihrer Ausdehnung deutlich voneinander (Koinzer et al. 2014b). Die Beschreibung von Photokoagulationsläsionen im OCT-Bild erfordert daher ganz eigene Kategorien, die sich nicht aus histologischen Kenntnissen ableiten lassen. Einmal etabliert, können diese OCT-Kategorien in vielen Fällen die Histologie ersetzen und damit Tiere schonen, Längsschnittstudien der Wundheilung an identischen Läsionen ermöglichen und den Forschungsaufwand deutlich reduzieren (Koinzer et al. 2013).

Experimentelle Ergebnisse zur Läsionsintensitäten

Da der Tierversuch, für retinale Laser insbesondere am Kaninchen, für die In-vivo-Prüfung und zur Sicherheitstestung neuer Geräte weiterhin etablierter und unersetzlicher Standard ist, muss die Läsionsklassifikation für OCT-Bilder zunächst hier ansetzen. In einer tierexperimentellen Studie applizierten wir in Vollnarkose 1.022 Photokoagulationsläsionen in sechs Augen von drei Kaninchen. Wir verwendeten einen leicht modifizierten konventionellen 532 nm Continuous-Wave-Laser (CW: Dauerstrich) wie er klinisch gebräuchlich ist (Visulas 532s vite, Carl Zeiss Meditec). Die Modifikation erlaubte eine nichtinvasive Temperaturmessung am Augenfundus unter der Laserbestrahlung, hatte aber keinen Einfluss auf die Wirkung des Behandlungslasers. Die Läsionen hatten einen Bestrahlungsdurchmesser von 133 µm am Fundus und ihre Intensität wurde von ophthalmoskopisch unsichtbar bis zu kräftiger Weißfärbung mit weißem Nekrosekern variiert. Nach zwei Stunden, einer Woche, einem und drei Monaten wurden die Kaninchenfundi mittels Fundusfotografie und SD-OCT (Spectralis HRA und OCT, Heidelberg Engineering) bildtechnisch erfasst und dann hinsichtlich Läsions sichtbarkeit und -durchmesser bewertet. Außerdem erfolgte eine Korrelation zu den Behandlungstemperaturen. Von 625 der applizierten Läsionen konnten wir OCT-Bilder aufnehmen. 22 Läsionen waren so sanft, dass auch mittels OCT keine Veränderung zu beobachten war. Von 603 nachweisbaren Läsionen gelang es uns bei 464 Läsionen, einen vollständigen Bilddatensatz zu erzeugen. Die resultierenden Bilder sichteten wir systematisch mit dem Ziel, gemeinsame morphologische Merkmale der laserinduzierten Veränderungen zu identifizieren. Wir konnten sechs unterschiedliche sichtbare Läsionsklassen mit aufsteigender Intensität ausmachen (Abb. 2). Diese Läsionsklassen entsprechen tatsächlich einer zunehmenden Intensität, wie treppenförmig ansteigende Werte für den prozentualen Anteil sichtbarer Läsionen, die Läsionsdurchmesser im Fundusbild, die Läsionsdurchmesser im OCT-Bild und die Läsionstemperaturen belegen (Tab. 1). Im OCT-Bild haben die laser-

induzierten Veränderungen einen größeren Durchmesser als im Fundusbild. Im Zeitverlauf der vier Untersuchungen nehmen die Durchmesser stetig ab.

Klinische Bedeutung der Läsionsklassen

RPE-selektive Lasertherapie: Im Zusammenhang mit moderner Photokoagulation sind insbesondere die Intensitätsklassen 0, 1 und 2 von Interesse. Läsionen der Klasse 0 bleiben am Fundus und im OCT unsichtbar, sind also echt unschwerflich. Konventionell ließe sich nicht nachweisen, ob solche Läsionen überhaupt einen Effekt erzeugen. Mit Hilfe der von uns verwendeten Temperaturbestimmung lässt sich aber feststellen, ob eine Läsion die Schadensschwelle des RPE überschritten hat (53 Grad Celsius, Denton et al. 2011). In diesem Falle wäre, da die Netzhaut OCT-morphologisch intakt geblieben ist, von einem reinen RPE-Schaden auszugehen. Selektive RPE-Läsionen haben sich in Pilotstudien klinisch unter anderem bei Retinopathia centralis serosa, diabetischer Makulopathie, zur Drusenreduktion bei trockener altersbedingter Makuladegeneration und zur Behandlung chronischer subretinaler Flüssigkeit nach Amotio-Chirurgie als wirksam erwiesen (Koinzer et al. 2008; Roeder et al. 2000; Roeder et al. 2010).

Zellschonende thermische Stimulationstherapie: Wurde die Läsion jedoch mit einer Temperatur unter 53 Grad Celsius erzeugt, lässt sich eine thermische Nekrose weitgehend ausschließen. In diesem Falle würde die Läsion als reine thermische Stimulation ohne Zelluntergang wirken. Eine solche thermische Stimulationstherapie ist der Gegenstand aktueller Lasergrundlagenforschung. Sie beeinflusst die Expression von Hitzeschockproteinen (HSP70) und wurde in Pilotstudien mit einem modifizierten PASCAL-Laser auch schon erfolgreich bei Retinopathia centralis serosa angewendet. Die Behandlung war wirksam, erforderte aber sehr große Herdzahlen (Lavinsky und Palanker 2014).

Läsionsklasse	% sichtbar (Fundusbild n. 2 Std.)	Ø Fundus n. 2 Std. [µm] Median	Ø OCT n. 2 Std. [µm] Median	Ø OCT n. 3 Mo. [µm] Median	Temperatur 200 ms-L. [°C] Mittelwert
1	17	0	148	102	-
2	56	86	193	127	61
3	89	120	239	157	62
4	98	163	279	190	65
5	97	178	320	214	71
6	95	196	426	278	80

Tab. 1: Die Tabelle zeigt für jede OCT-Klasse den Anteil funduskopisch sichtbarer Läsionen, die Durchmesser der Läsionen in Fundusbild und OCT zwei Stunden nach Applikation, den Durchmesser im OCT nach drei Monaten und die Temperatur. In der Studie wurden variable Bestrahlungszeiten verwendet. Die Temperaturangaben in dieser Tabelle beziehen sich jedoch nur auf die Untergruppe von Läsionen, die mit einer festen Bestrahlungszeit von 200 ms appliziert wurden. Sie geben die Spitzentemperatur am Ende der Bestrahlungszeit in der Läsionsmitte auf RPE-Niveau an. Die Klassenabhängigkeiten aller gezeigten Parameter sind statistisch signifikant. (Tab. mit freundlicher Erlaubnis von Wiley-Blackwell, modifiziert nach Koinzer et al. 2013*)

Weder bei thermischer Laserstimulationstherapie noch bei selektiven RPE-Schäden werden Gesichtsfeldeinschränkungen erzeugt und man kann davon ausgehen, dass auch Dämmerungs- und Kontrastsehen durch die Behandlung nicht beeinträchtigt werden. Inwieweit solche Behandlungsverfahren für panretinale Behandlungen wirksam sind, kann gegenwärtig noch nicht beantwortet werden.

Sub-visible-Lasertherapie: Läsionen der Klasse 1 waren im Fundusbild nach zwei Stunden mit 83 Prozent überwiegend unsichtbar. Ihr medianer Läsionsdurchmesser im Fundusbild betrug 0. Dennoch waren diese Läsionen im OCT-Bild deutlich zu erkennen. Ihr medianer Durchmesser im OCT-Bild war mit 148 µm in etwa so groß wie das Bestrahlungsareal. Das belegt, dass diese Läsionen eine biologische Wirkung in der Netzhaut entfaltet haben müssen. Dieser Läsionstyp entspricht dem, was in der modernen klinischen Laserforschung präzise als Sub-visible-Läsion (unsichtbare Läsion) bezeichnet wird, für die insbesondere im Zusammenhang mit Mikropulslasern aber auch oft der unpräzise Begriff Sub-threshold-Läsion (unterschwellige Läsion) Verwendung findet. Diese Bezeichnung ist unpräzise, weil neben der ophthalmoskopischen Schwelle weitere Schwellen, etwa der fluoreszenzangiographischen Sichtbarkeit oder des Zellunterganges im RPE, existieren, deren Unterschreitung biologisch zu völlig unterschiedlichen Läsionen führen würde. Für Sub-visible-Läsionen gibt es Pilotstudien, die eine gewisse Wirksamkeit auch für panretinale Behandlungen nahelegen (Luttrull et al. 2008). Weiterhin zeigte sich, dass eine Behandlung des diabetischen Makulaödems mit einer erhöhten Dichte solcher Läsionen wirksamer war als die klassische ETDRS-Behandlung mittels fokaler oder Grid-Laserkoagulation (Lavinsky et al. 2011).

Modulationen von ETDRS-Läsionen: Die höheren Läsionsklassen 2 bis 6 entsprechen Modulationen von verschiedenen intensiven überschwelligem, also klassischen Photokoagulationsläsionen. Für diese Läsionsintensitäten existierten bisher keine objektiven Unterscheidungskriterien. Sie würden es nun erlauben, für überarbeitete Behandlungsrichtlinien, etwa der diabetischen Makulopathie, eine Sollintensität vorzugeben und dazugehörig optimale Bestrahlungsdurchmesser und Rasterdichten anzugeben. Auf diese Weise ließe sich die Schadensintensität der Einzelläsionen verbindlich und überprüfbar reduzieren, was zu einer Reduktion der Nebenwirkungen führen würde. Es wäre denkbar, dass die makuläre Laserbehandlung damit wieder eine klinisch gleichwertige oder sogar überlegene Alternative zur intravitrealen VEGF-Hemmung werden könnte. Insbesondere die geringere Behandlungsfrequenz des Lasers wäre aus Sicht des Patienten, aber auch der Versorger deutlich von Vorteil.

OCT-Läsionsklassen am Patienten

Da die Klassifikation von Laserläsionen mittels OCT noch recht

neu ist, werden Läsionen in klinischen Laserstudien bisher nur in Ausnahmefällen vollständig auf ihre Intensität geprüft. Laserläsionen am humanen Fundus zeigen ein anderes Erscheinungsbild als die hier vorgestellten OCT-Befunde des Tierversuchs. Ein analoges Schema für die Verwendung am Patienten haben wir jedoch erarbeitet und publiziert (Koinzer et al. 2012a; Koinzer et al. 2014a). Auch am Patienten lassen sich mit Hilfe des OCT Läsionen nachweisen, die ophthalmoskopisch unsichtbar bleiben. Dieses Einteilungsschema wäre insbesondere deshalb nützlich, weil es die Läsionenintensität verschiedener Behandlungsgeräte, wie beispielsweise grüner CW-Rasterläsionen (20 bis 50 ms), grüner Standard-CW-Läsionen (100 bis 200 ms), infraroter Mikropulsläsionen und anderer direkt vergleichbar machen könnte. Damit würden auch die Ergebnisse einer Vielzahl kleinerer klinischer Studien mit unterschiedlichen Behandlungsgeräten in Metaanalysen vergleichbar werden.

Erzeugung von OCT-Klassen

Die Erzeugung von Laserläsionen einer bestimmten Klasse gelingt bisher nicht zuverlässig. Dafür wäre eine Echtzeit-Kontrolle der Läsionstemperatur erforderlich. Eine solche automatische Steuerung der Läsionsintensität auf der Basis von Temperaturmessdaten haben wir für Läsionen der Klasse 2 bis 3 bereits demonstriert (Koinzer et al. 2012b) und auch andere Intensitäten konnten wir im Tierversuch mittels automatischen Temperaturfeedbacks erfolgreich steuern. Die Anwendung der automatisch temperaturkontrollierten Photokoagulation am Patienten ist in absehbarer Zeit zu erwarten und wird dann endlich die Beantwortung der Frage nach dem unvermeidlichen Schmerz durch den Laser erlauben.

Fazit

Die deutlichen Nebenwirkungen, die die Laserphotokoagulation bis heute verursacht, könnten bald der Vergangenheit angehören. Bessere Standardisierung der Läsionen durch OCT-Analyse, Anpassung der Behandlungsprotokolle für eine optimierte Platzierung und Dichte sanfterer Läsionen sowie eine zuverlässige Steuerung der Läsionsintensität würden die Laserphotokoagulation so modernisieren, dass optimale Wirksamkeit mit gutem Behandlungskomfort vereint werden und die Behandlung mehr Attraktivität erlangen könnte.

*Abbildungen und Tabelle mit freundlicher Genehmigung von Wiley-Blackwell, modifiziert aus: Koinzer S, Hesse C, Caliebe A, Saeger M, Baade A, Schlott K, Brinkmann R & Roider J. Photocoagulation in Rabbits: Optical Coherence Tomographic Lesion Classification, Wound Healing Reaction, and Retinal Temperatures. *Lasers Surg Med* 2013 Sep;45(7): 427–436.

Literatur auf Anfrage in der Redaktion.

Dr. Stefan Koinzer

Funktionsoberarzt, Univ.-Augenklinik Kiel

E-Mail: koinzer@auge.uni-kiel.de